

ANNALES

DE L'INSTITUT PASTEUR

FONDÉES SOUS LE PATRONAGE DE **L. PASTEUR**

PAR

E. DUCLAUX

ET CONTINUÉES PAR

E. ROUX (1904)

A. CALMETTE (1922)

COMITÉ DE DIRECTION

Gab. BERTRAND, G. RAMON, J. TRÉFOUËL,
assistés des Professeurs et Chefs de service de l'Institut Pasteur,

Secrétaire général : A. BOQUET.

QR

1

A475

TOME SOIXANTE-TREIZIÈME

V.73

Janvier-Décembre 1947

1947

PER

PARIS

MASSON ET C[°], ÉDITEURS
LIBRAIRES DE L'ACADEMIE DE MÉDECINE
120, Boulevard Saint-Germain (6^e).

PARIS. — ANC. IMP. DE LA COUR D'APPEL, 1, RUE CASSETTE. — 1947

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

RECHERCHES IMMUNOCHIMIQUES
SUR LA BACTÉRIDIE CHARBONNEUSE

VII. — UTILISATION D'ÉTUDES QUANTITATIVES
POUR SUIVRE L'ÉPUISEMENT
D'UN IMMUNSÉRUM PAR UN MÉLANGE D'ANTIGÈNES

par ANNE-MARIE STAUB et PIERRE GRABAR (*).

(*Institut Pasteur.*)

Le problème de la protection de la souris par le sérum anti-charbonneux semble être éclairci, les anticorps anticapsulaires jouant chez cet animal le principal rôle [6]. Il n'en est pas de même avec le cobaye et le lapin : les anticorps anticapsulaires ne sont pas protecteurs, pas plus que les antipolyosides [9] ; ces deux groupes d'anticorps se trouvent d'ailleurs parmi les euglobulines, alors que dans le sérum de cheval que nous possérons, seules les pseudoglobulines protègent le cobaye et le lapin contre l'infection charbonneuse [2].

Nous nous sommes proposé depuis le début de nos recherches sur la bactéridie charbonneuse, d'obtenir un extrait susceptible d'éliminer les anticorps protecteurs du sérum par précipitation spécifique. Malheureusement, nos nombreux essais toujours négatifs ne nous ont pas permis, jusqu'à présent, d'apporter une solution au problème posé. Néanmoins, certains extraits ont donné lieu à quelques observations intéressantes pour l'étude générale des

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 2 mai 1946.

précipitations spécifiques. Nous avons déjà signalé celles obtenues avec un extrait acide [4]. Nous voudrions donner ici les résultats fournis par deux nouveaux extraits qui offrent des exemples particulièrement nets des difficultés que l'on peut rencontrer lorsqu'on essaie d'éliminer, par précipitation spécifique, certains anticorps d'un immunisérum. Avec l'un de nos extraits, les antigènes présents en s'unissant à leurs anticorps homologues forment des composés solubles. Avec l'autre, l'étude détaillée de la précipitation spécifique a montré qu'il existait plusieurs zones de précipitation. Dans l'un comme dans l'autre cas, seule une étude quantitative de la précipitation permet de déterminer les proportions d'extrait et de sérum nécessaires pour l'élimination complète des anticorps homologues.

MATÉRIEL ET TECHNIQUES.

Extraits bactériens. — Les extraits bactériens ont été obtenus en adaptant au *B. anthracis* (1) la méthode utilisée par Morgan et Partridge [7]. Celle-ci consiste essentiellement dans les opérations suivantes : extraction des bacilles secs par le phénol à 92 p. 100, précipitation des solutions phénoliques par l'alcool, dialyse du précipité, dissolution dans la soude de la fraction insoluble après dialyse. On obtient ainsi, après neutralisation, un extrait scindable en deux fractions distinctes, l'une soluble en milieu légèrement acide (pH voisin de 6) et précipitable seulement par l'acide trichloracétique : nous l'avons appelée la *fraction A*. L'autre insoluble à pH 6, c'est la *fraction B*.

Anticorps. — Le sérum et ses fractions utilisés dans les expériences sont ceux qui nous servent depuis le début de ces recherches et dont l'obtention a été décrite dans le premier de nos mémoires [10].

Techniques. — Ce sont les précipitations qualitatives, semi-quantitatives et quantitatives décrites antérieurement [10].

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX.

FRACTION A. — L'étude qualitative de la précipitation des fractions de sérum par ces extraits, nous a montré qu'ils précipitaient les euglobulines et les pseudoglobulines. La précipitation des euglobulines n'offre aucune particularité, nous ne nous y arrêterons pas. Par contre, la précipitation des pseudoglobulines est plus intéressante : ses études semi-quantitative, puis quantitative permettent d'y distinguer deux zones (tableau I et courbe fig.1).

On voit tout de suite que pour éliminer la totalité des deux groupes d'anticorps, il faut ajouter d'abord 0,5 cm³ puis 2,5 cm³ d'extrait. L'expérience suivante illustre ceci.

(1) La souche acapsulogène utilisée est la même que dans nos études précédentes [10].

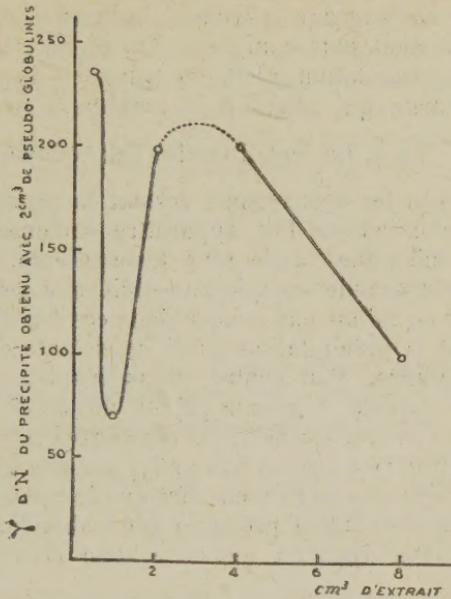


FIG. 1.

TABLEAU I. — Précipitation de 2 cm³ de pseudoglobulines par divers volumes d'extrait.

EXTRAIT EN CENTIMÈTRES CUBES	γ d'N dosés dans le précipité spécifique
0,5	236
1	68
2	200
4	200
8	100

Expérience.

γ d'N DOSÉS
dans le précipité

(C) 1 cm³ de pseudoglobulines + 1,25 cm³ d'extrait	470
(D) 1 cm³ de pseudoglobulines + 0,25 cm³ d'extrait	162
(E) Surnageant D + 1 cm³ d'extrait	97
	259

FRACTION B. — Comme pour la fraction A l'étude quantitative de la précipitation des euglobulines par les extraits B ne présente aucune particularité, on obtient une courbe à plateau dont le point d'équivalence (neutralisation des antigènes et des anticorps) se situe toujours aux environs du mélange

$$\frac{\text{vol. extrait}}{\text{vol. engl.}} = \frac{1}{2}$$

L'étude des mélanges « pseudoglobulines + extrait B » est par contre infiniment plus complexe. On n'observe, en effet, que rarement une précipitation réelle, la plupart du temps n'apparaît qu'une opacité qui atteint son maximum pour un rapport $\frac{\text{vol. extrait}}{\text{vol. pseudog.}} = 4 \text{ à } 6$. La centrifugation fait sédimenter quelquefois un précipité, mais les surnageants restent toujours très troubles. Parfois, la centrifugation fait apparaître seulement à la partie supérieure du tube une bande plus transparente. Tout ceci fait penser à la présence de complexes solubles « pseudoglobulines — extraits ». Il ne fallait pas songer dans ces conditions à étudier quantitativement la précipitation quasi inexistante des extraits par les pseudoglobulines. Par contre, nous inspirant des résultats acquis avec le liquide d'œdème [3] et un autre extrait bactérien [4], nous avons recherché si les complexes solubles « pseudoglobulines — extraits » n'étaient pas précipités par les euglobulines. L'expérience ci-dessous montre en effet que le sérum entier (euglobulines + pseudoglobulines) précipite plus abondamment que les seules euglobulines avec un même volume d'extrait.

	γ d'N dosés dans les précipités
Sérum	608
Euglobulines	374
Différence	237

Une difficulté naît toutefois du fait suivant. Nous avons vu qu'un volume d'extrait 4 à 6 fois supérieur à celui des pseudoglobulines était nécessaire pour obtenir le maximum d'opacité dans les mélanges « pseudoglobulines — extrait B », c'est-à-dire pour saturer les anticorps contenus dans cette fraction du sérum et susceptibles de s'unir aux antigènes microbiens des extraits étudiés. Par contre, nous savons qu'il suffit d'un volume d'extrait moitié de celui des euglobulines pour saturer les anticorps que contiennent celles-ci. On voit donc, que si l'on travaille avec un volume a de sérum (mélange en parties égales de nos solutions d'euglobulines et de pseudoglobulines) deux alternatives se posent : ou bien l'on ajoutera un volume x d'extrait tel que $x = \frac{a}{2}$, dans ce cas les euglobulines précipiteront, mais nous risquerons de n'entraîner qu'une fraction des anticorps contenus dans les pseudoglobulines ; ou bien x sera voisin de 4 à 6 a , cette fois les pseudoglobulines seront peut-être saturées par les antigènes microbiens, mais les composés solubles résultant de leur union ne seront pas entraînés par les euglobulines, celles-ci ne formant que peu de composés insolubles dans ces conditions.

Afin de réaliser des conditions *optima* pour la précipitation des

complexes « euglobulines + extrait + pseudoglobulines », nous avons donc été amenés à ajouter au sérum des euglobulines.

Soit a le volume de sérum utilisé, il nous faut ajouter environ $6a$ d'extrait pour saturer les anticorps contenus dans les pseudoglobulines. Les antigènes contenus dans le volume $6a$ nécessitent un volume d'euglobulines à peu près double pour les précipiter, soit $12a$. Il nous faut donc ajouter environ $11a$ volumes d'euglobulines. En fait, nous avons utilisé des solutions d'euglobulines concentrées afin d'éviter de trop augmenter les volumes.

Ces expériences ont parfaitement répondu à notre attente (tableau II).

TABLEAU II. — Précipitation de divers mélanges d'anticorps par un volume constant d'extrait (6 cm^3).

EXPÉRIENCE	EUGLOBULINES en cm^3	SÉRUM en cm^3	EUGLOBULINES concentrées ($1 \text{ cm}^3 = 5 \text{ cm}^3$ d'euglobulines)	MILLIGRAMMES d' N dosé dans le précipité spécifique	DIFFÉRENCE due aux pseudoglobulines en mg. d' N
<i>Extrait n° 10.</i>					
F	0	1	0	0,07	$\triangleleft 0,07$
G	1	0	3	3,10	
H	0	1	3	3,62	$0,52$
I	1	0	▲	3,14	
J	0	1	4	3,56	$0,42$
<i>Extrait n° 13.</i>					
K	1	0	2	1,08	
L	0	1	2	1,52	$0,44$
<i>Extrait n° 15.</i>					
W	1	0	3	3,54	
X	0	1	3	4,50	$0,96$
Y	1	1	3	3,52	
V	1	Pseudoglobulines normales. Pseudoglobulines spécifiques.	3	4,46	$0,94$

On voit, par exemple, que le précipité de l'expérience H (sérum) titre 3,62 mg. d' N , celui de l'expérience G (euglobulines) titre 3,10 mg. d' N , où la différence 0,52 mg. correspondant aux pseudoglobulines de 1 cm^3 de sérum précipité par 6 cm^3 d'extrait. Alors qu'en mélangeant le même volume d'extrait à 1 cm^3 de sérum sans adjonction d'euglobulines (expérience F), on obtient un précipité ne titrant que 0,07 mg., soit plus de sept fois inférieur.

On voit combien il serait vain d'espérer d'éliminer les anticorps

contenus dans les pseudoglobulines en ajoutant simplement l'extrait au sérum : d'où l'intérêt de cette technique aussi compliquée qu'elle puisse paraître au premier regard.

Les expériences V, W, X et Y montrent qu'il s'agit bien d'une précipitation spécifique des pseudoglobulines.

On note, en effet, que le précipité obtenu avec le mélange « euglobulines + pseudoglobulines normales » (Y) ne diffère pas de celui obtenu avec les euglobulines seules (W) aux erreurs d'expérience près ; tandis que les résultats obtenus soit avec le sérum (X) soit avec le mélange « euglobulines + pseudoglobulines spécifiques » (V), égaux entre eux, sont très supérieurs aux précédents. La différence atteint d'ailleurs dans cette expérience la valeur maxima que nous ayons observée.

CONCLUSION.

Des auteurs de plus en plus nombreux utilisent la méthode quantitative de Heidelberger (ici employée) pour suivre l'élimination, par un antigène déterminé, des anticorps homologues contenus dans un sérum antitoxique ou antimicrobien. Cela leur permet d'identifier ou non les anticorps précipités aux anticorps protecteurs suivant les résultats des essais *in vivo* effectués concurremment (antitoxine scarlatineuse [5], sérum antistreptocociques [8], anti-influenzae [1], etc.).

Dans la présente étude sur le sérum anticharbonneux, les résultats *in vivo*, non rapportés ici, ont montré que les anticorps précipités par les extraits phénoliques utilisés dans ce travail ne jouent aucun rôle dans la protection du cobaye, et par conséquent que ces extraits ne contiennent pas l'antigène vaccinant de la bactéridie charbonneuse. C'est la conclusion à laquelle seule une étude quantitative nous a permis d'aboutir étant donné la particulière complexité des faits observés.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] ALEXANDER (H. E.), HEIDELBERGER (M.) et LEIDEY (C. P.). *Yale J. Biol.*, 1943-1944, 16, 425.
- [2] GRABAR (P.) et STAUB (A. M.). Ces *Annales*, 1942, 68, 355.
- [3] GRABAR (P.) et STAUB (A. M.). Ces *Annales*, 1944, 70, 120.
- [4] GRABAR (P.) et STAUB (A. M.). Ces *Annales*, 1945, 71, 385.
- [5] HOTTLÉ (G. A.) et PAPPENHEIMER (A. M.). *J. exp. Med.*, 1941, 74, 545.
- [6] IVANOVICS (G.). *Zeitschr. Immunitätsf.*, 1938, 91, 436. — POCHON (J.). *Rev. Immunol.*, 1938, 4, 457.
- [7] MORGAN (W. T. J.) et PARTRIDGE (S. M.). *Bioch. J.*, 1942, 36, 1140.
- [8] MUDD (St), CZARNETZKY (E. J.), LACKMAN (D.) et PETTET (M.). *J. Immunol.*, 1938, 34, 117.
- [9] STAUB (A. M.) et GRABAR (P.). *C. R. Soc. Biol.*, 1943, 137, 623.
- [10] STAUB (A. M.) et GRABAR (P.). Ces *Annales*, 1944, 70, 16.

ÉTUDE D'UN SÉRUM ANTILEUCOCYTAIRE

MISE AU POINT D'UNE NOUVELLE MÉTHODE DE TITRAGE
MÉCANISME DE SON ACTION *IN VIVO*

NOUVELLES OBSERVATIONS SUR L'INHIBITION DE LA DIAPÉDÈSE

par A. DELAUNAY, J. PAGES et M. MAURIN (*)

Nous avons préparé notre sérum antileucocyttaire de la façon suivante qui est aussi une façon classique (1). On provoque un exsudat inflammatoire dans le péritoine de cobayes normaux par injection de bouillon stérile. On prélève cet exsudat alors qu'il renferme environ, pour 100 leucocytes, 80 polynucléaires et 20 éléments mononucléés. Aux globules blancs se trouvent constamment mêlées, en proportions variables, quelques hématies. L'exsudat est centrifugé et le culot repris rapidement par de l'eau distillée. Cette opération entraîne la lyse immédiate des globules rouges, mais n'altère pas de façon appréciable — étant donnée sa rapidité — l'état des globules blancs. On se débarrasse de l'eau distillée par une nouvelle centrifugation et les leucocytes sont lavés deux fois encore par du Ringer. Le dernier culot repris par du Ringer est injecté dans la veine de lapins neufs. Cette opération est répétée 10 fois en cinq semaines. Après une semaine de repos, les lapins sont saignés à blanc et leurs sérums, mélangés, mis stérilement en ampoules. Les ampoules sont déposées dans une glacière à + 3°. Deux mois plus tard, les sérums ne renferment plus de complément, d'après le test hémolytique mis en œuvre.

I. — TITRAGE DU SÉRUM ANTILEUCOCYTAIRE OBTENU.

En principe, ce sérum de lapin antileucocytes de cobaye renferme 3 types d'anticorps.

a) Des anticorps *antiglobules rouges de cobaye*. — Au cours des lavages des cellules inflammatoires, en effet, le stroma des hématies était demeuré avec les leucocytes. Ces anticorps sont faciles à titrer par la méthode hémolytique habituelle. Notre sérum était pauvre en anticorps *antiglobules rouges de cobaye*.

b) Des anticorps type Forssmann. — Spät (2) a en effet démon-

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 7 mars 1946.

(1) Voir, par exemple, W. B. Chew, D. J. Stephens et J. S. Lawrence.

J. Immunol., 1936, 30, 301.

(2) Zeitschr. f. Immunitätsf., 1914, 21, 565.

tré que les leucocytes du cobaye renferment, comme les organes de cet animal, et en particulier le rein et la capsule surrénale, l'antigène hétérogénétiqe de Forssmann. On peut aisément titrer ces anticorps par la méthode hémolytique (lyse des globules rouges de mouton qui, eux aussi, contiennent l'antigène de Forssmann). Notre sérum était riche en anticorps de Forssmann.

c) *Des anticorps spécifiques pour les globules blancs du cobaye.* — Ces derniers sont d'un titrage beaucoup plus délicat. Cellule vivante, le globule blanc ne se lyse pas avec la même facilité qu'un globule rouge. Il peut subir des *altérations morphologiques*, mais celles-ci sont toujours difficiles à interpréter. Examinée à l'état frais, et davantage encore après sa fixation, sur un frottis coloré, telle cellule normale fera penser arbitrairement à une cellule malade, telle cellule malade pourra paraître intacte. Tout titrage qui se base uniquement sur ces altérations morphologiques risque donc d'être entaché d'erreur. Aussi, avons-nous jugé nécessaire de recourir à une autre méthode. Celle dont nous nous sommes servis décèle la vitalité du globule blanc d'après la façon dont se manifeste une des *propriétés physiologiques* essentielles de cette cellule : le pouvoir qu'elle possède, à l'état normal, de se déplacer vers un corps qui l'attire. Voici comment, pratiquement, nous avons opéré.

Des *polynucléaires* provenant du péritoine enflammé de cobayes sont lavés deux fois avec la solution de Ringer puis repris par cette solution renfermant, en mélange, des quantités variables de notre sérum antileucocytaire et du sérum frais de cobaye, riche en complément (3) (par exemple sous un volume total de 2 cm³, 0,5 cm³, 0,2 cm³, ou 0,1 cm³, ou 0,05 cm³, etc., de sérum anti, et, dans tous les cas, 0,5 cm³ de sérum frais de cobaye). Les mélanges sont faits dans des tubes à hémolyse. Une goutte des diverses préparations est ensuite déposée sur des lames à la surface desquelles ont été fixés au préalable des grains d'amidon de pomme de terre. Chaque goutte est recouverte d'une lamelle. Celle-ci est lutée pour éviter la dessiccation, et les lames ainsi montées sont déposées, en même temps que les tubes contenant les suspensions leucocytaires pendant une heure, dans une étuve à 37°. L'heure étant écoulée, on retire de l'étuve les tubes et les lames et on les examine.

a) *Examen des tubes.* — Il est déjà, à lui seul, instructif.

Dans les tubes renfermant 0,5 cm³, 0,2 cm³ et 0,1 cm³ de sérum antileucocytaire, on voit une agglutination remarquablement nette (4); les leucocytes se sont déposés au fond des tubes pour y

(3) Nous avons montré précédemment (*Société Française de Microbiologie*. Séance du mois de mai 1945) qu'un tactisme leucocytaire ne peut se produire qu'en présence de complément.

(4) Il est à peine besoin de préciser qu'en présence de sérum de

former un petit culot, *non adhérent au verre*. Par agitation des tubes, les culots se remettent en suspension, mais de façon imparfaite. De gros flocons, non dissociables, subsistent. A l'examen entre lame et lamelle, ces flocons apparaissent constitués par des leucocytes agglutinés. Une dilution au 1/20 de notre sérum antileucocyttaire suffit donc pour exercer une action antileucocyttaire, en l'espèce une agglutination. En revanche, des dilutions supérieures se sont montrées sans effet. En présence de ces dilutions, les globules blancs ne se sont pas agglutinés ; ils ont tapissé sur une assez large surface le fond des tubes *en collant aux parois*. Il était relativement difficile de les remettre en suspension par simple agitation.

Cet examen des tubes donne à lui seul un premier renseignement sur la valeur d'un sérum antileucocyttaire en faisant connaître le pouvoir agglutinant d'un tel sérum. Cependant, il est insuffisant car il n'indique pas, comme peut le faire l'examen des lames, l'état de souffrance des cellules.

b) *Examen des lames.* — Des leucocytes normaux, déposés sur des lames préparées comme on l'a dit plus haut et se trouvant dans un milieu convenable (par exemple dilution en Ringer de sérum de lapin normal au 1/4), se dirigent rapidement vers les grains d'amidon ; en moins d'une heure presque tous les grains sont sertis par plusieurs cellules. Dans le cas qui nous intéresse ici, nous avons retrouvé ce phénomène typique sur toutes les lames où avaient été déposés des leucocytes dans une dilution de notre sérum antileucocyttaire supérieure au 1/20. Morphologiquement, les polynucléaires semblaient en bon état, mais la meilleure preuve de leur vitalité résidait manifestement dans le fait qu'ils s'étaient dirigés vers les grains d'amidon. Sur les autres lames qui supportaient des globules blancs en présence de dilutions d'antisérum inférieures au 1/20, le tactisme a fait au contraire défaut. Il n'y avait pas de collerette cellulaire autour de l'amidon. Les leucocytes étaient répartis sans ordre sur la lame. Certains étaient agglutinés. Certains présentaient aussi des altérations morphologiques : par exemple, dans la cellule, le noyau, polylobé, se détachait nettement, ce qui est — selon nous — un signe certain de mort. D'autres éléments paraissaient normaux. Cependant, ils ne s'étaient pas déplacés. On pouvait donc admettre que leur vitalité était diminuée.

De ces divers examens, nous avons conclu que notre sérum antileucocyttaire avait effectivement le pouvoir, à doses fortes, de détruire les leucocytes, mais que son action nocive ne s'étendait

lapin normal, cette agglutination fait défaut. De même, en ce qui concerne l'examen des lames, le tactisme se déroule toujours convenablement lorsqu'on opère avec des leucocytes se trouvant placés dans des concentrations même très fortes de sérum de lapin normal.

pas au delà d'une dilution égale au 1/20. On pourrait s'étonner de cette activité médiocre. Il ne faut pas oublier cependant, comme nous le disions au début de cette communication, qu'il est impossible de comparer les globules blancs à des globules rouges. Ceux-ci, petits sacs inertes, se laissent détruire facilement ; pour cette raison, les sérum hémolytiques sont souvent de valeur élevée. Les globules blancs au contraire, cellules vivantes, complexes, opposent toujours aux phénomènes de lyse, une résistance marquée. Nous le constatons encore en ce moment, alors qu'avec notre collègue Pillet, nous étudions l'action de la leucocidine staphylocoque sur les leucocytes.

C'est aussi en fonction de cette résistance évidente aux processus de désagrégation que le test que nous venons de décrire nous paraît beaucoup plus sensible que tous ceux qui font état de modifications morphologiques plus ou moins discutables. Lui seul peut vraiment renseigner sur l'état véritable des cellules, sur leur état de vie ou de mort, car de toute évidence, des cellules normalement mobiles qui ne se déplacent plus, malgré les conditions favorables du milieu (présence de complément dans ce milieu), doivent être considérées à bon droit comme malades. Notre test est aussi très simple à mettre en œuvre. Nous croyons qu'il peut rendre service à tous ceux qui se livrent à des examens physiologiques sur les leucocytes, et qui veulent étudier l'action sur ces cellules de tel ou tel produit (toxine, substance antibiotique, etc.).

II. — MÉCANISME D'ACTION « IN VIVO » DU SÉRUM ANTILEUCOCYTAIRE EN CAUSE.

Injecté dans le péritoine de cobayes normaux, à la dose de 1 cm³ ou de 1,5 cm³, notre sérum de lapin antileucocytes de cobaye (5) a placé les animaux dans un état de torpeur et d'abattement assez prononcé. Au cours des heures qui ont suivi l'injection, la pression de l'abdomen était douloureuse. On pouvait noter aussi une leucopénie nette.

Introduites par voie intraveineuse, des doses fortes (1,5 cm³, 2 cm³) du même sérum antileucocytaire ont tué rapidement les cobayes. (A l'autopsie on trouvait des hémorragies diffuses surtout intestinales). Des doses moyennes (1/2 cm³, 1 cm³) ont épargné la vie des animaux mais ont provoqué une intoxication profonde : abattement, prostration avec poils hérisrés, leucopénie souvent très marquée. Si, au moment même de l'injection intraveineuse d'antisérum, on avait introduit dans la peau ou dans le péritoine des cobayes, des staphylocoques, la réaction inflammatoire locale qui prenait place se caractérisait — pendant toute la phase aiguë

(5) Une dose identique de sérum de lapin normal ne provoque bien entendu aucun trouble apparent chez le cobaye.

de l'intoxication — par une absence totale ou presque totale de polynucléaires. Nous retrouvions en somme, point par point, toutes les manifestations classiques qui succèdent à l'injection chez l'animal d'un sérum antileucocyttaire (6).

Une question se posait alors. Comment agissait notre sérum antileucocyttaire ? Fallait-il imputer l'état d'intoxication que nous avions sous les yeux à une simple lyse des globules blancs, semblable à celle qu'on peut observer *in vitro* et qui résulte de la destruction des cellules sous l'effet combiné des anticorps antileucocytaires et du complément ? Nous ne l'avons pas pensé pour plusieurs raisons. Nous rappelons tout d'abord que le sérum antileucocyttaire en cause était peu puissant. Dilué au 1/25, il ne tuait plus, *in vitro*, les globules blancs. Or 1 cm³ de ce sérum introduit dans le péritoine d'un cobaye de 350 g. suffisait pour provoquer une intoxication. Il se trouvait pourtant dilué dans les humeurs à un degré tel qu'il aurait dû perdre toute activité.

Mais une expérience très simple suffisait à montrer que l'intoxication produite avait une tout autre cause que la destruction des globules blancs.

Nous avons provoqué une réaction inflammatoire dans le péritoine de cobayes. Lorsque l'exsudat formé fut riche en polynucléaires, nous y avons injecté 1,5 cm³ de sérum antileucocyttaire. Puis après un temps de contact variable (une heure ou deux heures) nous avons ponctionné la cavité péritonéale et examiné les leucocytes de l'exsudat. Ceux-ci étaient agglutinés, mais morphologiquement ils semblaient intacts, et avec les méthodes appropriées il nous a été facile de démontrer que dans le milieu même où ils reposaient ces leucocytes étaient parfaitement capables de se mouvoir (tactisme vers les grains d'amidon) et de phagocyter. Le contact, *au sein de l'organisme*, avec le sérum antileucocyttaire n'avait donc pas altéré les cellules. A vrai dire, le fait n'a rien d'étonnant lorsqu'on se rappelle la faible action spécifique *in vivo* que présentent en général tous les sérums cytotoxiques.

La cause véritable de l'intoxication produite ne pouvant être trouvée dans une lyse massive des cellules du sang, un autre mécanisme devait être cherché. Nous nous sommes demandé si cette intoxication n'était pas le résultat de phénomènes anaphylactoides déterminés par la mise en contact *in vivo* des anticorps apportés par l'antisérum avec les antigènes correspondants. Notre sérum antileucocyttaire renfermant, comme nous l'avons dit, 3 types d'anticorps, il fallait rechercher lequel de ces anticorps était à incriminer.

a) Nous avons facilement éliminé les anticorps *antiglobules rouges* de cobaye. En effet si l'on injecte dans la veine de cobaye le sérum antileucocyttaire débarrassé par adsorption de ses anti-

(6) Arch. of Path., 1939, 28, 31.

corps antiglobules rouges de cobaye, ce sérum provoque un état d'intoxication en tous points semblable à celui que nous avons décrit.

b) Nous avons ensuite envisagé le cas des anticorps de Forssmann. Pour connaître leur toxicité propre pour le cobaye, nous avons injecté dans la veine de cet animal des doses variables d'un sérum de lapin antiglobules rouges de mouton, c'est-à-dire d'un sérum porteur d'anticorps de Forssmann, mais ne renfermant pas d'anticorps spécifiques pour les globules blancs de cobaye. Nous avons produit dans ces conditions une intoxication rappelant de très près celle qui résultait de l'action du sérum antileucocytaire : prostration, leucopénie, absence de polynucléaires dans les foyers inflammatoires évoluant chez les animaux intoxiqués. Cependant, à doses comparables, le sérum de lapin antiglobules rouges de mouton s'est montré moins毒ique que notre sérum antileucocytaire. Il renfermait cependant une plus grande quantité d'anticorps de Forssmann. Nous pouvions donc admettre que notre sérum antileucocytaire devait sa toxicité — mais en partie seulement — aux anticorps hétérologues qu'il renfermait.

c) Pour déterminer enfin le pouvoir toxique des derniers anticorps qui nous restent à considérer : les anticorps spécifiques pour les globules blancs du cobaye, nous avons privé par adsorption spécifique un échantillon de notre sérum antileucocytaire à la fois de ses anticorps antiglobules rouges de cobaye et de ses anticorps de Forssmann. Ce sérum, ainsi traité, s'est encore montré nettement toxique pour le cobaye.

De toutes ces expériences nous avons conclu :

1^o Qu'un sérum antileucocytes de cobaye peut se montrer toxique pour le cobaye.

2^o Que l'intoxication qu'il provoque ne relève pas de la simple destruction des globules blancs — en réalité, la vitalité de ceux-ci ne paraît pas souffrir de la présence *in vivo* de l'antisérum — mais qu'elle est due à des perturbations d'ordre anaphylactoïde, qui résultent d'une interaction entre les anticorps apportés par le sérum antileucocytaire et les antigènes correspondants, ces antigènes étant représentés par l'antigène de Forssmann, les antigènes propres aux leucocytes et probablement aussi des antigènes communs aux leucocytes et aux autres cellules de l'organisme du cobaye.

Sur le mécanisme même de ces perturbations, nous sommes encore bien mal renseignés et nous n'en dirons rien ici. Nous insisterons simplement, pour clore ce travail, sur une des conséquences de ces perturbations, qui se traduit par l'absence des leucocytes dans les foyers inflammatoires. Les auteurs américains W. B. Chew, D. J. Stephens et John S. Lawrence (1), qui ont observé ce fait les premiers, admettent que cette absence des leu-

cocytes est secondaire à une destruction marquée de ces cellules. Nous ne sommes pas de leur avis. En fait, nous avons montré qu'*in vivo*, un sérum antileucocyttaire respecte la vie du globule blanc et la libre mise en jeu de ses diverses propriétés physiologiques. Nous pensons pour notre part, qu'une telle absence cellulaire dans les tissus enflammés est secondaire à une *inhibition de la diapédèse*.

Nous rappelons ce qu'est ce phénomène que nous avons découvert pour la première fois chez les cobayes intoxiqués par une endotoxine bactérienne (7). Chez ces animaux, les leucocytes, bien que parfaitement normaux, n'arrivent plus à franchir les barrières endothéliales pour se rendre au sein du tissu conjonctif, vers les substances qui les attirent. Les conséquences d'un tel phénomène sont graves car elles mettent l'organisme dans un état de moindre résistance vis-à-vis des contaminations bactériennes (8). Jusqu'à présent, nous n'avions retrouvé une telle inhibition de la diapédèse que lors d'intoxication par une endotoxine. Avec les faits que nous exposons aujourd'hui, nous apportons la preuve que cette inhibition peut faire aussi partie du tableau d'un autre type d'intoxication : celle qui résulte de réactions anaphylactoïdes.

Cette constatation, croyons-nous, n'est pas simplement intéressante par sa nouveauté ; elle présente aussi l'avantage de nous guider dans la recherche du mécanisme même de cette inhibition de la diapédèse. On savait déjà qu'au cours des phénomènes anaphylactiques le système capillaire, dans son ensemble, est l'objet d'importantes modifications. On a signalé depuis longtemps la leucopénie, la rétention des leucocytes dans les capillaires du poumon, etc. Nous croyons que l'inhibition de la diapédèse relève de la même cause que ces diverses anomalies, et l'orientation actuelle de nos recherches nous fait penser de plus en plus que cette cause profonde est d'ordre neuro-hormonal.

(7) Ces *Annales*, 1945, **71**, 431.

(8) Ces *Annales*, 1945, **71**, 168.

CULTURES DE TISSUS APPLIQUÉES A LA SOLUTION DE PROBLÈMES IMMUNOLOGIQUES.

III. — NOUVELLES RECHERCHES. SUR LE TACTISME DES MACROPHAGES *IN VITRO*

(par E. LASFARGUES et A. DELAUNAY.)

INTRODUCTION.

Dans leur majorité, les cellules mobiles sont capables de manifester une sensibilité chimiotactique. Les Amibes, certaines Algues, des Myxomycètes (1), etc., des Bactéries même, peuvent, dans certaines conditions, orienter leurs déplacements sous l'influence de facteurs chimiques. Tout récemment, on a pu mettre en évidence le tactisme des spermatozoïdes à l'égard de substances spécifiques ; par exemple, Kuhn a montré que l'ovule d'oursin élabore la gynogamone I (échinochrome) encore capable, à d'extraordinaire dilutions, d'accélérer les mouvements des spermatozoïdes (action activante) et de les attirer (chimiotactisme).

On pouvait donc penser que les grands phagocytes mobiles de l'organisme — polynucléaires, macrophages — étaient, eux aussi, susceptibles de se déplacer dans un sens bien défini. De fait, de très nombreuses expériences ont permis de démontrer l'attraction des polynucléaires par des microbes, les produits qui en dérivent et des substances fort variées. A ce sujet nous citerons les importants travaux de Buchner, Massart et Bordet, Sicherer, Zilberberg et Zeliony, etc., qui l'observèrent sur l'animal vivant. Plus près de nous, R. Meier, Mc Cutcheon et son école, Grand et Chambers, utilisant la technique des cultures de tissus, réussirent mieux encore à la mettre en évidence.

En ce qui concerne les macrophages, au contraire, toutes les recherches qui jusqu'à présent avaient été tentées pour démontrer leur tactisme avaient échoué. Récemment encore, en 1940, Dale Rex Coman (2), ayant placé des staphylocoques et des bactéries tuberculeux près de fragments de rate cultivés *in vitro* ne notait aucune migration des cellules mononucléées vers ces germes. En 1942, le grand spécialiste américain des recherches sur le

(1) Voir à propos des myxomycètes l'article récent de D. R. COMAN, *Arch. Path.*, 1940, 29, 220.

(2) *Arch. Path.*, 1940, 30, 896.

tactisme leucocytaire en culture de tissus, Morton Mc Cutcheon, pouvait écrire dans une Revue générale (3) que, parmi les globules blancs des mammifères, seuls, les polynucléaires jouissaient d'une nette sensibilité chimiotactique. Nous avons donc été très intéressés le jour où nous avons observé un tactisme indiscutable des *macrophages* dans l'une de nos cultures de tissus. Voici dans quelles conditions.

OBSERVATION FONDAMENTALE (4).

a) TECHNIQUE. — Nous avons souvent besoin pour nos recherches, au laboratoire, de cultures de macrophages. Celles-ci sont obtenues de la façon suivante : de petits fragments de la zone marginale de la rate d'un cobaye adulte sont ensemencés dans un milieu comprenant II gouttes de plasma hépariné de cobaye et II gouttes d'un suc nutritif (jus embryonnaire ou jus de rate). En repiquant ces préparations, on obtient régulièrement de belles cultures de cellules qui, en se développant autour de l'explant, lui donnent un aspect chevelu ; ce sont des *fibroblastes*. En bordure de la zone fibroblastique, on rencontre de nombreuses cellules libres, les unes étoilées, munies de prolongements cytoplasmiques parfois ramifiés (*histiocytes*), les autres arrondies, entourées le plus souvent d'une large membrane ondulante et renfermant de nombreuses vacuoles (*macrophages*). Histiocytes et macrophages sont des cellules très voisines ; on peut même à l'heure actuelle dire qu'elles représentent seulement deux états particuliers d'un seul type de cellules. La rate de cobaye adulte, ensemencée comme nous l'avons dit plus haut, représente un matériel très commode pour étudier les macrophages.

b) TACTISME. — Nous avons constaté, un jour, que l'une de ces cultures, accidentellement contaminée, continuait de bien pousser malgré la présence à sa périphérie d'une colonie microbienne en voie de prolifération. Les jours suivants, le phénomène devint encore plus curieux lorsque nous vîmes l'ensemble des macrophages se diriger électivement vers cette colonie. Quelques cellules l'atteignirent même et commencèrent de la phagocytter. Le fait devant lequel nous nous trouvions était très net : le microbe infectant avait attiré les macrophages (fig. 1). Il nous parut assez intéressant pour que nous poursuivions son étude.

c) ÉTUDE DU MICROBE INFECTANT. — Nous avons isolé tout d'abord le microbe en cause.

(3) *Arch. Path.*, 1942, 34, 167.

(4) Voir notre communication préliminaire faite à la Société de Biologie le 8 décembre 1945.

Il s'agissait d'un petit coecus, non mobile, Gram positif, en grappes, (aspect de staphylocoque), donnant sur gélose des cultures abondantes, non pigmentées, muqueuses. Ce coccus liquéfie la gélatine et fait fermenter le glucose, le saccharose et légèrement le lactose. Il est absolument non pathogène pour la souris et le cobaye. L'injection sous-cutanée ou intrapéritonéale chez la souris, de 1 à 2 cm³ d'une suspension fortement concentrée de microbes

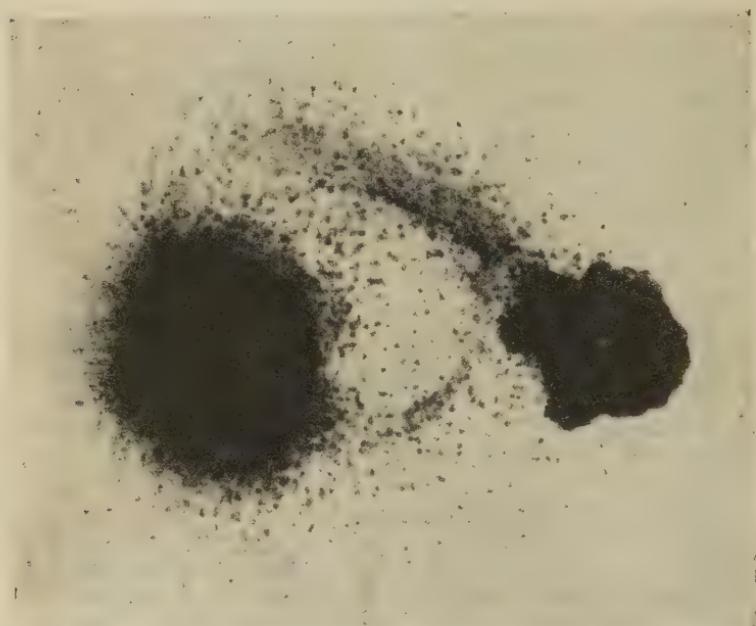


FIG. 1 (M. Jeantet). — Tactisme très net des macrophages quittant la colonie cellulaire et se dirigeant vers la colonie microbienne (à droite).

vivants et chez le cobaye de 2 à 5 cm³ de la même suspension, n'a provoqué, en dehors de la réaction locale, aucun trouble physiopathologique grave. Ce microbe enfin, que nous appelons commodément *souche L. D.*, ne produit pas de toxine nécrosante.

d) INFECTION EXPÉRIMENTALE. — Avec ce germe vivant nous avons préparé, en Ringer, une suspension renfermant environ un milliard d'éléments par centimètre cube. Une goutte de cette suspension fut ajoutée à des cultures de rate fraîchement prélevée, laissant émigrer de nombreux polynucléaires, et à des cultures ayant déjà subi quelques passages, donc riches en macrophages.

Dans tous les cas, malgré cette contamination massive, les cel-

lules ont continué de vivre, et le milieu n'a pas subi de processus lytique appréciable. Dans le premier cas, nous avons observé une phagocytose énergique, par les polynucléaires, de tous les germes se trouvant à leur portée, ce qui déterminait autour du fragment splénique un halo clair, amicrobien, caractéristique. Par ailleurs, dans les cultures de macrophages artificiellement contaminées,



FIG. 2 (M. Jeantet). — Attraction des macrophages par une colonie microbienne (infection expérimentale d'une culture.)

nous avons assisté très souvent au tactisme de ces cellules vers les colonies microbiennes les plus voisines (fig. 2).

OBSERVATIONS PORTANT SUR D'AUTRES GERMES.

a) Nous avons essayé de reproduire des résultats du même ordre avec d'autres germes non pathogènes (Gram+ et Gram-) également prélevés dans l'air de notre laboratoire, mais dans presque tous les cas, nous ne pûmes découvrir qu'un tactisme cellulaire très médiocre vers les colonies. Très souvent d'ailleurs, les germes, fibrinolytiques, rendaient toute observation impossible.

b) Nous avons également contaminé des cultures de macrophages avec des staphylocoques pathogènes. Dans ces cas, les cellules dégénérèrent rapidement. Les macrophages présentèrent de nom-

breuses enclaves graisseuses et moururent sans manifester le moindre tactisme.

Notre souche L. D. présente donc un comportement particulier. Nous attribuons les résultats positifs qu'elle nous a permis d'obtenir à deux causes : a) cette souche n'est pas du tout fibrinolytique, b) elle ne libère dans le milieu de culture aucun produit toxique susceptible d'altérer la vitalité cellulaire.

Poursuivant nos recherches, nous avons essayé de déterminer les constituants des microbes L. D. responsables de l'attraction des macrophages.

IDENTIFICATION DE PRODUITS MICROBIENS PROVOQUANT LE TACTISME DES MACROPHAGES.

a) OBTENTION DE CES PRODUITS. — En principe, les substances libérées par le microbe L. D. dans le milieu ambiant et provoquant le tactisme des macrophages pouvaient relever d'une double origine. Ou bien elles étaient élaborées par des germes vivants à la façon des exotoxines, ou bien ces substances correspondaient à de véritables constituants des corps microbiens mis en solution au cours de l'autolyse spontanée de certains germes. Pour recueillir les unes et les autres, nous avons opéré de la façon suivante :

1^o *Centrifugats.* Des tubes de bouillon furent ensemencés avec la souche L. D. et conservés à 37°. Après un intervalle de temps variable, allant de un à quinze jours, les tubes étaient retirés de l'étuve et leur contenu centrifugé (12.000 tours). Les liquides surnageants étaient ensuite maintenus à la glacière jusqu'au moment de l'expérience.

2^o *Autolysats.* Les autolysats furent préparés selon la méthode classique. L'autolyse se poursuivait pendant quarante-huit heures à 37° en présence de toluène. Nous avons pu extraire de ce liquide des protéines par précipitation acétique et isoler l'ensemble des substances à petites molécules, par ultrafiltration. Nous n'avons pas réussi à isoler des polysaccharides.

b) TECHNIQUE D'EXAMEN EN CULTURES DE TISSUS. — Pour étudier le pouvoir chimiotactique des constituants microbiens en solution, nous avons eu recours à la technique suivante : de petits morceaux de plâtre ou des fragments de papier chardin, de 1 mm² environ, étaient stérilisés à l'autoclave, puis imbibés par l'une ou l'autre des solutions préparées. D'autres morceaux de plâtre ou d'autres fragments de papier chardin, imbibés de Ringer, servaient de témoin. Finalement ils étaient tous introduits dans nos cultures de macrophages avant la coagulation du plasma, à proximité (1 mm.) du tissu ensemencé.

c) RÉSULTATS. — 1^o *Centrifugats.* — Nous n'avons observé avec eux aucun tactisme des macrophages.

2^o *Autolysats.* — En revanche, nous avons souvent constaté une nette migration de ces cellules vers le papier Chardin imprégné du liquide provenant d'un autolysat (5). Cette migration se fait très lentement ; elle s'amorce à peine au bout de vingt-quatre heures, devient sensible après quarante-huit heures, mais n'est pleinement développée que trois jours après la mise en culture. Il n'est guère possible avec notre méthode de prolonger les observa-



FIG. 3 (M. Jeantet). — Les macrophages de la culture sont attirés par le fragment de plâtre qui a été imbibé avec un liquide d'autolysat microbien.

tions, car à partir du 4^e jour les cultures montrent des symptômes de souffrance de plus en plus marqués. Les cellules, qui parviennent au contact du papier Chardin, s'y accollent.

3^o *Protéines.* — Les macrophages se dirigent également vers les fragments imbibés de protéines microbiennes. Cependant, le tactisme apparaît dans ce cas moins intense et plus irrégulier qu'en présence du liquide d'autolysat brut.

(5) Selon toute vraisemblance, ce liquide diffuse peu à peu dans le milieu ambiant.

4^o Petites molécules. — Les substances à petites molécules furent obtenues par le procédé suivant : une bougie L., coiffée par un sac de collodion était plongée dans un autolysat débarrassé des corps microbiens. On faisait le vide dans la bougie, et au bout de quelques heures on recueillait dans celle-ci un liquide clair renfermant les produits recherchés (ultrafiltrats).

Les fragments de papier Chardin imprégnés de ce liquide n'ont pratiquement pas attiré les macrophages.

5^o Polysaccharides. — Nous ne sommes pas parvenus à extraire de polysaccharides de la souche L. D. où ils n'existaient qu'à l'état de traces. Nous avons pu néanmoins préparer une solution riche en polysaccharides à partir d'une autre souche microbienne : le bacille typhique. Des fragments de papier Chardin, imbibés de cette solution, ont attiré nettement les macrophages de nos cultures.

ETUDE DU TACTISME DES MACROPHAGES VERS DES PRODUITS NON MICROBIENS.

Afin de préciser, davantage encore, nos connaissances sur tous ces phénomènes de tactisme, nous avons recherché l'action de substances diverses, d'origine non microbienne, susceptibles de les déterminer.

Technique. — Des solutions très concentrées (5 mg. par centimètre cube) ont été préparées avec les produits suivants :

Sucres : glucose, xylose, glucosamine, arabinose.

Acides aminés : glycocolle, leucine, tryptophane, histidine, arginine.

Polysaccharides : amidon soluble, glycogène, gomme arabique.

Peptides : peptone de Witte et peptone Vaillant.

Acides thymo et ribonucléiques.

Bases puriques : adénine.

Selon notre technique habituelle, des fragments de papier Chardin furent imprégnés avec ces diverses solutions et placés à proximité de cultures de rate de cobaye au départ (polynucléaires) et de cultures de macrophages. Nous avons pu comparer ainsi l'importance du tactisme des polynucléaires et de celui des macrophages vis-à-vis des mêmes substances. Nos résultats sont exposés dans le tableau ci-après.

Les résultats exposés dans ce tableau nous paraissent instructifs. Dans presque tous les cas le tactisme des polynucléaires a été très net. Nous avons retrouvé pour beaucoup de corps les faits déjà observés dans les mêmes conditions par Chambers et Grand (6). Dans certains cas, nous avons pu noter aussi un tactisme des macrophages, et notamment vers des substances qui attirent particulièrement bien les polynucléaires. Cependant ce tactisme n'a jamais été très marqué ; souvent même il a fait défaut, par exemple, pour les acides nucléiques.

(6) *J. Cellular a Comp. Physiol.*, 1936, 8, 1.

SUBSTANCES ÉTUDIÉES	TACTISME DES	
	Polynucléaires	Macrophages
<i>Sucres :</i>		
Glucose	±	0
Xylose	0	±
Glucosamine	++	+
Arabinose	++	+
<i>Acides aminés :</i>		
Glycocolle	+	Tactisme douteux.
Leucine	+	Tactisme douteux.
Tryptophane	+	0
Histidine	±	0
Arginine	++	+
<i>Polysaccharides :</i>		
Amidon soluble	++	+
Glycogène	++	±
Gomme arabique	0	0
<i>Peptones :</i>		
Witte	++	±
Vaillant	++	±
<i>Acides nucléiques :</i>		
Thymo	++	0
Ribo	++	0
<i>Base purique :</i>		
Adénine	+	0

CONCLUSIONS.

En nous basant sur les nombreuses observations que nous venons de rapporter, nous formulerois les conclusions suivantes :

1° On peut admettre comme un fait certain que les macrophages, à l'exemple de toutes les cellules mobiles, sont capables de se déplacer vers des corps qui les attirent.

2° Il est vrai cependant qu'il n'y a aucune comparaison possible entre la sensibilité chimiotactique des polynucléaires et celle des macrophages. La première est infiniment plus prononcée que la seconde. On comprend ainsi que beaucoup d'auteurs aient échoué en cherchant à mettre celle-ci en évidence. Si le hasard ne nous avait pas servis, en nous montrant avec la souche L. D., l'existence d'un tactisme *indiscutable* des macrophages, nous n'aurions pas par la suite cherché systématiquement à retrouver ce tactisme dans différentes conditions. La lenteur du déplacement des macrophages vers les produits chimiotactiques rend en effet le plus souvent très difficile l'observation du phénomène.

D'ailleurs une question importante se pose au sujet de ce tactisme.

Sous l'influence des produits libérés par les corps étrangers mis dans la culture (protéines, polysaccharides, etc.), il pourrait y avoir non seulement attraction cellulaire, mais encore multiplication cellulaire.

On sait, en effet, que les macrophages en culture peuvent se multiplier par mitose lorsque les conditions sont favorables (Carrel, Ephrussi, etc.). Ces mitoses sont toujours difficiles à observer ; elles le sont davantage encore avec la méthode que nous employons en boîtes de Petri. Personnellement, nous n'en avons jamais constaté ; nous ne pouvons pas affirmer toutefois que celles-ci faisaient totalement défaut.

Que certaines substances soient capables d'exciter la multiplication des macrophages, le fait n'apparaît guère douteux (Carrel). Certains auteurs ont même admis en principe, (Fischer), que des produits microbiens (protéoses par exemple) pourraient agir dans le même sens. Cette question n'a jamais été approfondie, mais l'existence de « tréphones » produites par des bactéries paraît probable. C'est un sujet de travail qui nous semble intéressant et que nous venons d'aborder.

LE FACTEUR "Rh" SA RÉPARTITION CHEZ LES PARISIENS ET LES LOIS DE SON HÉRÉDITÉ

par N. KOSSOVITCH et A. EYQUEM (*).

(*Institut Pasteur. Laboratoire de Sérologie.*)

En 1940, Landsteiner et Wiener (1) se sont aperçus que des cobayes immunisés avec des globules rouges de *Macacus rhesus* fournissaient un sérum permettant de mettre en évidence un nouvel agglutinogène dans les globules rouges d'un très grand nombre de sujets humains. La présence de cet agglutinogène semblait indépendante des groupes sanguins classiques A, B, AB, O et des facteurs M, N, P, Q. Landsteiner et Wiener appellèrent ce nouveau facteur le « facteur Rhesus » (« Rh »). Quant à l'agglutinine anti-Rh, sa présence est très rare dans les sérum humains normaux ; on ne l'a décrite que dans quelques cas [Wiener et Forer (2)] et il semble qu'elle appartienne, comme l'agglutinine anti-P, aux « cold agglutinins ».

Au début de 1942, Landsteiner a envoyé de New-York à quelques laboratoires d'Europe des échantillons de sérum anti-Rh préparés en Amérique au moyen de globules rouges de *Macacus rhesus* et de globules humains contenant le facteur Rh. L'un de ces envois était adressé au Laboratoire de Sérologie de l'Institut Pasteur et contenait des indications très précises sur la préparation du sérum anti-Rh. C'est avec ce sérum de Landsteiner que l'un de nous a effectué les premières recherches sur la répartition du nouvel agglutinogène chez les Français (3). Notre laboratoire a ensuite préparé lui-même les sérum agglutinants qui nous servent maintenant pour toutes nos recherches.

Depuis les premières publications, les travaux sur ce sujet se sont multipliés : on a découvert de nombreux sous-groupes du facteur Rh et la question s'est compliquée au point qu'on en est

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 7 février 1946.

(1) K. LANDSTEINER et A.-S. WIENER, *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1940, **43**, 228.

(2) A.-S. WIENER et FORER, *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1941, **47**, 215.

(3) N. KOSSOVITCH, *C. R. Soc. Biol.*, 1944, **138**, 767.

arrivé à utiliser plusieurs nomenclatures, tant en ce qui concerne les sérum (agglutinines) que les globules rouges (agglutino-gènes). La terminologie employée par les différents auteurs est tellement variée qu'elle en devient individuelle et arbitraire. Ainsi Fisher, Wiener (4) désignent leurs sous-groupes par les chiffres Rh₀, Rh₁, Rh₂, Rh', Rh'', etc. ; Cappell (5) introduit les termes de sérum anti-C, anti-D, anti-E et anti-c ; l'école de Cambridge utilise l'alphabet grec (6) ; les Russes comptent 9 à 10 sous-groupes, etc. D'autre part, tous ces sous-groupes dépistés par les divers sérum anti-Rh constituent-ils véritablement des gènes héréditaires, ou bien les différences enregistrées ne traduisent-elles que des différences de titre ? La question n'est pas tranchée à l'heure actuelle. Trop peu de temps s'est encore écoulé depuis la découverte du facteur Rh pour qu'on puisse répondre avec certitude. N'oublions pas qu'il a fallu vingt ans pour établir l'existence réelle, comme gènes héréditaires, des sous-groupes du groupe A. Dix ans seulement après la découverte des groupes sanguins, von Dungern et Hirschfeld ont pressenti l'existence de sous-groupes du groupe A ; puis quelques années après, Landsteiner, O. Thomsen et Friedenreich ont prouvé le caractère génétique des sous-groupes A₁, A₂ et A₃, et dernièrement enfin Gammelgaard a montré que la liste n'était pas étroite et qu'il fallait s'attendre à découvrir A₄, A₅, ... A_x. Quant aux facteurs M₂ et N₂, on discute encore pour savoir s'il s'agit de véritables gènes ou seulement de différences de titre.

Pour toutes ces raisons nous n'avons pas, dans les présentes recherches, tenu compte des sous-groupes du facteur Rh. Nous nous sommes bornés à étudier la répartition et les lois de l'hérédité de ce facteur chez les Parisiens, comme Landsteiner et Wiener l'avaient fait pour les Américains et les Chinois.

L'intérêt tout particulier qu'a dès le début suscité le facteur Rh est dû à son importance dans les transfusions sanguines. Dès l'origine, en effet, on a constaté qu'un receveur rh— soumis à des transfusions répétées de sang Rh+ pouvait former des agglutinines anti-Rh qui finissaient par hémolyser les globules rouges du donneur. C'est le cas qu'on rencontre assez fréquemment chez les femmes nouvellement accouchées subissant de nombreuses transfusions. D'autre part, le facteur Rh serait responsable de l'érythroblastose fœtale et d'autres affections du sang du nouveau-né, entraînant diverses complications pour la mère et pour l'enfant. Dans le cas d'un père Rh+ et d'une mère rh—, l'enfant peut être Rh+ ; la présence de Rh chez le fœtus peut provoquer la formation d'agglutinines anti-Rh chez la mère,

(4) A.-S. WIENER, *Science*, 1944, 99, 532.

(5) CAPPELL, *Glasgow med. J.*, nov. 1944, 125.

(6) R.-A. FISHER et R.-R. RACE, *Nature*, 1946, 157, 48.

agglutinines qui traversent le placenta et hémolysent le sang de l'enfant ; inversement, les agglutinines formées chez l'enfant peuvent hémolysier le sang de sa mère. C'est pourquoi de nombreux jeunes gens font examiner leur sang avant le mariage, afin d'y dépister une incompatibilité éventuelle de Rh.

Toutes ces raisons expliquent qu'un si grand nombre de chercheurs se soient attachés à l'étude du facteur Rh, dont l'importance s'est révélée aussi bien théorique (anthropologie, génétique) que pratique. L'examen de nombreuses familles effectué en Amérique, en Angleterre, en Allemagne, a conduit à supposer que cet agglutinogène est un caractère héréditaire et que son hérédité, qui suit la première loi de Mendel, est basée sur l'existence de deux gènes allélotomorphes, la présence de Rh étant un caractère dominant, son absence (rh), un caractère récessif, dominé, et l'on a établi le schéma probable suivant de son hérédité :

GÉNOTYPE	PHÉNOTYPES
Rh × Rh	Rh (100 p. 100) homozygotes.
Rh × rh	Rh (100 p. 100) hétérozygotes.
rh × rh	rh (100 p. 100) homozygotes.
ou	
RhRh × RhRh . .	Rh (100 p. 100) homozygotes.
RhRh × Rhrh . .	Rh homo- et hétérozygotes.
Rhrh × Rhrh . .	Rh (homo- et hétérozygotes) et rh (homozygotes).
rhrh × rhrh . .	rh (100 p. 100) homozygotes.

RECHERCHES PERSONNELLES.

Avant d'exposer les résultats de nos recherches, nous dirons quelques mots de la technique que nous avons utilisée.

Les sérum agglutinants anti-Rh ont été préparés suivant la méthode de Landsteiner et Wiener : immunisation du cobaye et du lapin avec des globules rouges de *M. rhesus* ou des globules rouges humains contenant le facteur Rh. Tous les examens ont été effectués, *mutatis mutandis*, sur lames et dans des tubes à hémolyse (Landsteiner). Les sanguins que nous avons étudiés nous ont été fournis par les Maternités de Paris et par différents praticiens de clientèle privée (7).

I^o RÉPARTITION DU FACTEUR Rh. — Nous avons examiné 380 sujets hommes, femmes et enfants (66 garçons et 76 filles). Voici les résultats que nous avons obtenus.

Rh 324 sujets (137 hommes et 187 femmes), ce qui donne 85,26 p. 100.
rh 56 sujets (25 hommes et 31 femmes), ce qui donne 14,74 p. 100.

(7) Nous remercions les professeurs Portes et Chabrun, de la Maternité de Port-Royal, qui ont eu l'extrême amabilité de nous ouvrir leurs services et de permettre nos recherches.

Si, à ce nombre, on ajoute celui obtenu antérieurement par l'un de nous dans la répartition générale chez les Français, on aura $380 + 462 = 842$, dont 695 Rh, soit un pourcentage de 82,54.

Répartition par sexe.

Hommes	{	Rh 137, ce qui représente 84,55 p. 100 (82 pères et 55 fils). (pères et fils).
Femmes	{	Rh 187, ce qui représente 85,77 p. 100 (121 mères et 66 filles). (mères et filles).

Comme on le voit, il n'y a pas de différence notable dans le pourcentage entre les deux sexes : celui de Rh est un peu plus élevé chez les femmes que chez les hommes.

La répartition du facteur Rh d'après les groupes classiques ABO montre que ce facteur est indépendant du système ABO : 324 Rh sur un total de 380 sujets.

2° HÉRÉDITÉ. — Dans le but d'étudier l'hérédité du facteur Rh nous avons examiné dans les Maternités 142 familles, dont 96 familles comprenant père, mère et enfants, et 46 familles comprenant mère et enfants. Voici les résultats obtenus :

	PARENTS		ENFANTS
	♂	♀	
70 familles	Rh × Rh		68 Rh et 2 rh
12 familles	Rh × rh		8 Rh et 4 rh
13 familles	rh × Rh		6 Rh et 7 rh
1 famille.	rh × rh		0 Rh et 1 rh

Dans 46 familles, mère et enfants, la répartition était :

	ENFANTS
34 mères dont les globules rouges possédaient Rh.	34 Rh
5 mères dont les globules rouges étaient rh.	5 Rh
4 mères appartenant au groupe Rh+.	4 rh
3 mères appartenant au groupe rh—	3 rh—

Il ressort de ces tableaux que, dans les combinaisons matrimoniales Rh × Rh et Rh × rh on trouve des enfants Rh homo- et hétérozygotes. Avec des parents rh × rh, l'enfant est toujours rh homozygote et récessif.

Ces constatations sont compatibles avec l'hypothèse que l'hérédité de Rh est basée sur une paire de gènes allélomorphes simples, Rh et rh, qui suit la loi de Mendel, où Rh est dominant et rh récessif. Malheureusement, les combinaisons rh × rh, qui sont les plus intéressantes du point de vue de l'hérédité, sont très peu nombreuses, aussi bien dans nos exemples que dans ceux d'autres auteurs.

3° CLINIQUE. — Nous dirons quelques mots aussi des conséquences que peut entraîner pour l'enfant le mariage entre un sujet Rh et un sujet rh. Notre expérience à cet égard est encore limitée ; nous croyons cependant utile de rapporter quelques premières observations.

Les médecins des Maternités où nous avons effectué nos recherches nous ont confirmé que l'érythroblastose foetale et les autres affections graves du sang qui seraient, d'après les auteurs américains, dues au facteur Rh, ne sont pas fréquentes ; ils ne nous ont cité qu'un cas sur 500 accouchements. Nous n'avons pas eu l'occasion d'examiner des sanguins de nouveau-nés atteints d'érythroblastose.

En ce qui concerne l'ictère du nouveau-né, les cas se répartissent de manière analogue parmi les différentes catégories de couples lorsqu'il s'agit d'ictère d'une durée de deux à quatre jours. Mais, dans le cas de mère rh et enfant Rh (cas que nous avons rencontré treize fois sur 142 familles examinées), nous avons constaté :

Une fois un ictère de huit jours assez intense.

Une fois un enfant d'aspect mongoloïde, vomisseur, décédé à un mois, n'ayant pas présenté de syphilis décelable.

Une fois un ictère intense chez un nouveau-né dont les frères avaient été atteints à leur naissance d'ictère intense.

Enfin des médecins de clientèle privée demandent souvent à notre laboratoire d'effectuer la recherche du facteur Rh. Voici quelques observations qui méritent d'être rapportées.

Premier cas. — Couple dont la femme actuellement enceinte avait eu un premier enfant mort, d'après le diagnostic clinique, d'érythroblastose. Les globules rouges de cette femme étaient ARh+ ; son sérum, même avec l'utilisation du « blocking test », ne contenait pas d'agglutinines pour les globules rouges ORh+ provenant de douze donneurs différents. Les globules rouges du père étaient ARh+. Comme on le voit, il s'agit ici d'un cas où les globules rouges sont compatibles quant au facteur Rh.

Deuxième cas. — Couple ayant eu plusieurs macérés et mort-nés sans causes évidentes. Les globules rouges du père étaient Rh+, ceux de la mère rh—.

Troisième cas. — Ictère grave du nouveau-né et mort quatre jours après la naissance. Les globules rouges du père étaient ARh+, ceux de la mère BRh+.

On voit que la combinaison de Rh et rh, si elle peut expliquer certains faits pathologiques chez le nouveau-né, semble insuffisante dans d'autres cas. Les agglutinines pour des antigènes de sous-groupes de Rh nous permettront peut-être une compréhen-

sion plus satisfaisante, à moins que n'intervienne encore un autre facteur, comme dans le cas de Levine, Katzin et Burnham (8), qui ont rencontré des agglutinines irrégulières (« warm agglutinins »), provoquant les mêmes troubles que ceux décrits par Landsteiner et Wiener pour l'érythroblastose.

(8) Ph. LEVINE, E.-M. KATZIN et L. BURNHAM, *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1940, **45**, 346.

RECHERCHE SUR L'ACTIVITE RELATIVE DES MICROORGANISMES CELLULOLYTIQUES AEROBIES ET ANAEROBIES DANS LE SOL

par J. POCHON et Y. T. TCHAN. (*)

Les processus biologiques de décomposition de la cellulose dans le sol sont d'une extrême importance : le tonnage de matière végétale ainsi transformée annuellement à la surface du globe est considérable et, surtout, ces processus libèrent du carbone sous une forme telle qu'il peut alors être utilisé comme aliment énergétique par l'ensemble des germes du sol et, en particulier, par ceux qui conditionnent le cycle de l'azote.

Or, si les micro-organismes qui sont responsables de ces activités nous sont bien connus chacun pour leur part, et ont suscité un nombre considérable de recherches, il n'en est pas de même dès qu'il s'agit de préciser leur rôle respectif dans le sol. Tous les auteurs sont à peu près d'accord pour n'accorder que peu d'importance aux Actinomycètes, qui ne feraient guère qu'utiliser les produits de métabolisme des cellulolytiques, et aux thermophiles, qui ne seraient actifs que dans les fumiers (Waks-mann et Skinner, 1926 [1]). Mais lorsqu'il faut évaluer d'une façon un peu précise l'activité relative des Bactéries aérobie, anaérobies et des Champignons, les renseignements manquent à peu près complètement. Des notions empiriques font attribuer, suivant les auteurs, un rôle prépondérant aux Bactéries aérobie ou aux Champignons, tout au moins dans les sols de culture, normalement travaillés, et sous les climats tempérés.

La raison en est le manque de méthodes adéquates pour ce genre de recherches. L'examen microscopique direct du sol par impression sur lame [2] et l'examen direct après centrifugation fractionnée, mis au point par Winogradsky [3], rendent d'immenses services en microbiologie du sol, mais, dans ce cas particulier, ils ne peuvent donner que peu de renseignements : la morphologie des germes est trop peu variée pour permettre un diagnostic précis et surtout il s'agit de micro-organismes tellement répandus qu'ils sont presque constamment trouvés à l'examen des sols mais que cette simple présence ne présume en rien de leur activité ; ils peuvent parfaitement se trouver, et certains se trouvent, certainement, à l'état de vie latente.

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 6 décembre 1945.

La même critique peut être adressée aux méthodes de cultures « totales ». Par exemple, quel que soit l'échantillon de sol prélevé, nous avons toujours trouvé, à la fois, des Bactéries aérobies par ensemencement sur plaque au silico-gel avec feuille de papier, et des Bactéries anaérobies, par ensemencements sur milieu salin, type Oméliansky, avec papier. Ce genre d'expériences ne permet donc de tirer aucune conclusion sur l'activité réelle de ces deux types de germes, à un moment donné, dans un sol donné, soumis à des conditions écologiques données ; *a fortiori* ne sont-elles pas favorables à l'expérimentation sur l'évolution éventuelle de la flore cellulolytique en corrélation avec des variations physiques et chimiques du sol.

Cependant on a pu, dans certains cas, par addition massive de certaines substances au sol, ou par modification brutale des conditions physiques, noter un changement dans la flore ; encore, en ce qui concerne les cellulolytiques, les résultats sont-ils insignifiants. L'addition d'une grande quantité de cellulose à la terre, si celle-ci est de réaction acide, amène une brusque prolifération des Champignons (Winogradsky [4], Waksman et Starkey [5]). La neutralisation d'un sol acide par le carbonate de chaux ne semble avoir que peu d'influence sur l'activité moyenne totale des cellulolytiques, mais par contre, semble favoriser les Bactéries aux dépens des Champignons (Christensen [6], Waksman et Starkey). Enfin, l'humidité du sol paraît avoir une certaine importance, l'optimum étant légèrement au-dessous du point de saturation (Charpentier, Waksman et Skinner, Winogradsky [7]).

Les résultats les plus précis ont été obtenus par Waksman et Skinner (1926) en utilisant des plaques de gélose à l'albumine d'œuf (technique de Waksman, 1922 [8]) encore que les auteurs reconnaissent que « des résultats sur le rôle des bactéries, dans la décomposition de la cellulose dans le sol, basés seulement sur la méthode des plaques, seraient loin de représenter une image vraie de ce processus dans le sol ».

Les notions nouvelles apportées par ces auteurs, du point de vue qui nous occupe, portent essentiellement sur le rôle de l'azote assimilable ; en effet, les Champignons, et vraisemblablement les Bactéries, utilisent 1 partie d'azote pour 30 parties de cellulose décomposée ; les fixateurs d'azote ne pouvant se servir directement du carbone de la cellulose comme aliment énergétique, l'activité des cellulolytiques est conditionnée par l'existence d'une certaine réserve d'azote assimilable (minéral et organique). Par addition de doses croissantes d'azote (nitrate de sodium), Waksman et Skinner montrent que le taux de cellulose détruite est proportionnel à la quantité d'azote disponible, mais cette analyse chimique du phénomène ne leur permet pas de préciser quel est le type de micro-organismes favorisé, cependant ce ne sont cer-

taînement pas les Bactéries anaérobies. Pour Waksmann et Dubos (1927) [9], d'ailleurs, l'équilibre de la flore cellulolytique ne serait pas modifié dans ce processus. Enfin la stérilisation partielle du sol par un antiseptique volatil, portant surtout sur les Champignons, entraîne un arrêt de la cellulolyse ; un ensemencement ultérieur avec de la terre amène une prolifération abondante de Champignons et une reprise de la cellulolyse ; aussi Waksmann et Skinner font-ils jouer un rôle prépondérant à ces organismes dans les sols riches en azote, bien aérés et suffisamment humides.

On voit donc combien sont fragmentaires nos connaissances. Aussi avons-nous essayé de reprendre la question et d'en faire une étude systématique. Il nous fallait tout d'abord mettre au point une technique qui permettrait :

1^o Une étude directe du sol, sans aucune modification, avec sa flore totale.

2^o De faire varier les conditions physiques et chimiques du sol et de suivre facilement les modifications d'équilibre de la flore cellulolytique totale.

Nous nous sommes inspirés de la méthode utilisée par Winogradsky pour déterminer le degré d'anaérobiose des fixateurs d'azote (colonnes de verre remplies de terre). Les germes cellulolytiques étant chromogènes, nous avons tiré parti de ce caractère pour la mise au point de notre technique. En effet, si on introduit une bande de papier entre la paroi de la colonne et la terre, le développement de germes produira des taches sur le papier, taches colorées qui seront perceptibles à travers le verre. Mais nous désirions essentiellement aussi avoir des renseignements sur le potentiel d'oxydo-réduction à différentes hauteurs dans les colonnes au cours de la culture. Dans ce but nous avons utilisé une gamme de quatre colorants de rII en traits parallèles verticaux sur la bande de papier. Nous aurions voulu également suivre des modifications éventuelles de pH, mais le pouvoir tampon de la terre utilisée s'est montré suffisant pour maintenir constant le pH de départ au cours de la culture (c'est-à-dire pour nos échantillons, au voisinage de la neutralité).

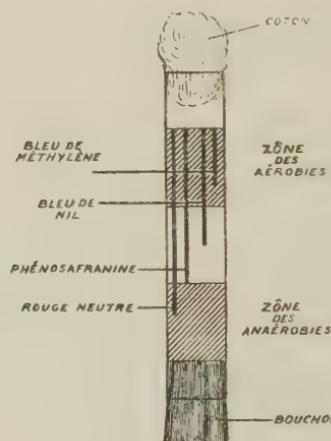
Voici le détail de la technique (Y. T. Tchan) [10] :

Utiliser des colonnes de verre de 25 mm. de diamètre et de 20 à 30 cm. de longueur. Préparer des bandes de papier filtre épais (type Chardin rapide) de 4 cm. de largeur. Tracer au pinceau quatre lignes, espacées de 0,7 cm. environ, avec les colorants suivants :

rII	COLORANTS
14	Bleu de méthylène.
9,2	Bleu de Nil . . .
5,8	Phénosafranine . .
3,4	Rouge neutre. . . . à 4 p. 1.000 aqueux.

sécher la bande de papier à l'étuve. L'introduire dans la colonne, fixer un des bouts par un bouchon de caoutchouc et laisser l'autre extrémité dépasser la partie supérieure de la colonne. Préparer une terre d'une humidité convenable (entre 25 et 35 p. 100), en remplir la colonne en maintenant le papier contre la paroi ; tasser la terre en laissant tomber à petits coups la colonne, du côté bouché au caoutchouc contre la table. Quand la colonne est jugée suffisamment tassée, couper la bande de papier au niveau de la terre et couvrir celle-ci avec une rondelette de papier filtre ; boucher avec un peu de coton.

En somme, nous avons réalisé un cylindre de terre enveloppé d'abord par une couche de papier, puis par du verre. L'une des extrémités est au contact de l'air, l'autre en est isolée par le bouchon de



caoutchouc. Après incubation, on voit apparaître des colorations variées sur le papier et les indicateurs se décolorent suivant les zones de rH réalisées au cours de la culture.

Cette méthode est simple, facile à réaliser et très pratique. Aucun ensemencement ni enrichissement n'est intervenu ; la terre ne subit aucune modification ; en un mot, on peut dire que l'on se trouve dans les conditions naturelles. Le niveau d'anaérobiose est déterminé conjointement par la flore microbienne et la réduction des indicateurs de rH.

Nous avons étudié le rôle des facteurs suivants : température, humidité, tassement, taux d'azote fourni. En réalité tous ces facteurs s'intriquent les uns les autres, aussi, après les avoir étudiés séparément, nous faudra-t-il montrer la complexité du phénomène dans son ensemble.

Voici tout d'abord, pour fixer les idées, le résultat d'une culture dans des conditions moyennes (température de 26°, humidité à 30 p. 100, tassement moyen, azote total à 0,9 p. 1.000, azote nitrique 0,035 p. 1.000, pas d'azote ammoniacal).

Après trois jours de séjour à l'étuve apparaissent tout d'abord dans la partie supérieure de la colonne des taches jaunes citron de *B. cellulolytiques* aérobies et, avec un léger retard, des taches noirâtres de champignons. En cinq jours environ, elles descendent jusqu'à 15 centimètres de l'extrémité supérieure, puis se stabilisent. Cette zone correspond à celle où le bleu de méthylène reste coloré. Au-dessous, sur une hauteur de 5 à 8 centimètres, le bleu de méthylène est décoloré ($rH=14$) et le bleu de Nil est partiellement décoloré ($rH=9,2$) ; la phénosafranine et le rouge neutre restent colorés ; aucun germe ne pousse, la bande de papier reste vierge. Au-dessous de cette deuxième zone, une troisième zone s'étend jusqu'à l'extrémité inférieure de la colonne. Le rouge neutre et la phénosafranine sont décolorés ($rH=3,1$) ; des taches jaune ocre et brunes de *B. cellulolytiques* anaérobies apparaissent vers le huitième jour (voir schéma). Nous pouvons donc conclure que les *B. aérobies* et les champignons prolifèrent jusqu'à $rH=14$ et au-dessus ; les *B. anaérobies* à partir de $rH=5,8$ et au-dessous. Dans toutes nos expériences, ces relations entre les zones de rH et les zones de culture ont été constantes.

INFLUENCE DE LA TEMPÉRATURE.

Toutes conditions restant les mêmes, nous avons réalisé des cultures à 15°, 27°, 33-35°, 45°.

A 15°, tous les indicateurs, et en particulier le bleu de méthylène, restent partout colorés ; la zone de culture des *B. aérobies* et des champignons s'étend jusqu'au bas de la colonne ; les champignons sont plus envahissants que les bactéries.

A 27°, c'est le schéma moyen décrit plus haut ; rappelons que le rH de 14 est atteint à 7 cm. de profondeur et le rH de 5,8 à 15 cm.

A 35° et au-dessus, le rH de 14 est atteint à 5 cm. de profondeur et, dans cette petite zone supérieure, il y a une légère prolifération des *B. aérobies* et des champignons. A 7 cm., le rH est déjà tombé à 5,8 ; c'est, jusqu'au bas de la colonne, le domaine des *B. anaérobies*. (A 45° nous avons constaté la présence de bacilles aérobies thermophiles dont nous poursuivons l'étude.)

Ainsi, plus la température s'élève, plus les anaérobies sont favorisés ; au-dessus de 35°, ils restent pratiquement seuls actifs. Le temps de latence avant la prolifération des anaérobies, très long à 27° (dix jours) est considérablement raccourci à 35° (cinq jours). Aussi pensons-nous, contrairement à l'opinion de Waks-mann et Skinner, que ce n'est pas la pauvreté relative du sol en germes anaérobies qui détermine cette phase de latence, mais bien plutôt les conditions favorables ou défavorables de culture.

INFLUENCE DE L'HUMIDITÉ.

Il s'agit là d'un facteur assez difficile à définir car, suivant l'état physico-chimique du sol, un même taux d'humidité (exprimé en poids d'eau p. 100 de terre) donne des degrés d'imbibition très différents. C'est pourquoi certains auteurs préfèrent évaluer le degré d'humidité en pourcentage de saturation ; mais la mesure n'en est guère plus précise.

Toutes autres conditions restent égales, on note une prolifération croissante des anaérobies avec des taux croissants d'humidité.

A 15 p. 100 et au-dessous, il n'y a que quelques rares taches de champignons (il faut cependant tenir compte du fait que, dans ce cas, le peu d'adhérence des grains de terre au papier rend défavorable la manifestation d'une culture). Le bleu de méthylène reste évidemment coloré jusqu'au bas de la colonne.

De 25 à 35 p. 100, ce qui correspond à 1/2 ou 3/4 de saturation, on note le schéma moyen déjà indiqué.

Au-dessus de 35 p. 100, c'est-à-dire à saturation et sous couche d'eau, seuls les anaérobies entrent en ligne de compte, le bleu de méthylène étant décoloré jusqu'en haut de la colonne.

INFLUENCE DU TASSEMENT.

Ici surtout, il est difficile d'obtenir une mesure précise ; nous définissons arbitrairement et empiriquement le tassement par le nombre de secousses imprimées à la colonne, dans les conditions indiquées à la technique ; nous avons ainsi réalisé une échelle allant de 5 à 30 coups (disons, pour fixer les idées, que la hauteur de la terre, dans la colonne, pour 30 coups, correspond aux 4/5 de la hauteur à 5 coups, pour un poids égal de terre).

Les résultats, comme il était à prévoir, montrent que plus le tassement augmente, plus la zone d'anaérobiose s'étend aux dépens de la zone d'aérobiose. A 5 coups, le bleu de méthylène est partout coloré ; B. aérobies et champignons envahissent toute la colonne. A 30 coups, le bleu de méthylène est réduit à 3 cm. du haut de la colonne, le bleu de Nil à 5 cm. ; au-dessus, c'est la zone des aérobies ; au-dessous, celle des anaérobies.

INFLUENCE DE LA TENEUR EN AZOTE.

Toutes conditions égales, nous avons enrichi la terre en nitrate de sodium ou en sulfate d'ammonium (1 à 20 p. 1.000 en azote du poids de terre). Nous avons noté une intensité croissante de l'attaque de la cellulose, sans déplacement net des zones ; il ne semble pas que l'enrichissement en azote favorise un type de germes plus qu'un autre, sauf, peut-être, les champignons.

CONCLUSIONS.

Les résultats obtenus par les expériences analytiques précédentes, chaque facteur variant isolément, peuvent être résumés de la façon suivante :

Plus la température est élevée, plus la zone des anaérobies s'étend et approche de la surface du sol et plus l'activité de ces bactéries est intense et précoce. Au-dessus de 35°, les aérobies (B. et champignons) sont pratiquement inactifs, les anaérobies régnant jusqu'à 3 cm. de la surface.

Plus le taux d'humidité augmente, plus la zone des anaérobies s'étend ; à saturation et sous couche d'eau, les anaérobies sont seuls actifs.

Plus le tassemment augmente, plus la zone des anaérobies s'étend.

La relation entre la flore d'une zone et le rH de cette zone est fixe : dans la zone des aérobies, le rH est toujours supérieur à 14 ; dans la zone des anaérobies, il est inférieur à 5,8 et descend parfois jusqu'à 3,1.

Inutile de dire que les variations concomitantes de plusieurs facteurs peuvent agir de façon synergique ou antagoniste et cela est d'une extrême importance au point de vue des sols, dans les conditions naturelles.

Dans un sol bien travaillé, régulièrement enrichi en azote, bien aéré, sous un climat tempéré où la température oscille entre 5 et 25° suivant la saison et la profondeur (moyenne du bassin parisien), sans périodes prolongées de pluies intenses, les conditions optima se trouvent réalisées pour les champignons et les B. aérobies jusqu'à une profondeur de 30 cm. environ, ce qui est la profondeur moyenne utile pour la plupart des cultures saisonnières. Dans ces sols, l'activité relative des champignons et des bactéries sera surtout fonction de la réaction de la terre (Waks-mann et Dubos) ; les premiers seraient surtout favorisés par un pH acide (sols humiques des forêts, par exemple) ; les seconds par un pH alcalin (sols amendés à la chaux).

A l'opposé, dans les sols tropicaux où la température moyenne en surface dépasse couramment 35°, presque constamment imbibés à saturation par les pluies, ou même noyés sous une couche d'eau, comme c'est le cas des rizières, toutes les conditions se trouvent réalisées pour que travaillent uniquement les anaérobies.

Dans les cas intermédiaires, réalisés par toutes les associations possibles de facteurs, on peut imaginer une action synergique à prédominance variable, des aérobies et des anaérobies : il nous semble que lorsque tous les facteurs favorisant les anaérobies se trouvent associés, le seuil, pour chacun d'eux, est suffisamment bas pour que de telles conditions soient réalisées, à une profondeur relativement faible, même sous nos climats tempérés.

Il s'agit d'un équilibre biologique variable suivant les saisons et réversible. Notre méthode nous a permis de bien mettre ce fait en évidence : dans une colonne placée à 33°, tassemment moyen imbibée à saturation ; le bleu de méthylène est réduit jusqu'à 3 cm. de la surface et les anaérobies remontent jusqu'à ce niveau. En laissant cette colonne un temps suffisant à l'étuve, l'évaporation assèche la partie supérieure du sol et le bleu de méthylène se recolore jusqu'à une profondeur de 15 cm. ; corrélativement, on assiste à une reprise d'activité des B. aérobies que l'on voit descendre dans cette zone de rH redevenu supérieur à 14 et qui était auparavant le domaine des anaérobies.

En réalité, les phénomènes sont plus complexes encore. Nous avons en effet étudié les variations de la flore cellulolytique en fonction de différentes variables ; mais il est bien évident que les autres germes du sol, soumis aux mêmes variations, réagissent également. Les faits que nous avons observés sont sans aucun doute conditionnés par l'ensemble des processus du sol ; précisons : les modifications des zones de rH sont corrélatives des variations de la flore cellulolytique et du reste de la flore du sol. Si, comme il est probable, certains germes ont une croissance plus rapide que celle des cellulolytiques, c'est à eux que peut revenir l'initiative dans les phénomènes d'oxydo-réduction.

En d'autres termes, les faits que nous avons observés et que nous avons analysés sont la résultante d'actions complexes. Leur réalité dans le sol ne fait aucun doute, mais leur déterminisme intime dépend de trop de facteurs pour que nous puissions prétendre l'avoir élucidé d'une façon définitive.

BIBLIOGRAPHIE .

- [1] WAKSMANN et SKINNER. *J. Bact.*, 1926, **42**, 57.
- [2] CHOLODNY. *Arch. Mikrob.*, 1930, 620 et 1934, 148.
- [3] WINOGRADSKY. Ces *Annales*, 1925, **39**, 229 et 1932, **48**, 89.
- [4] WINOGRADSKY. Ces *Annales*, 1929, **43**, 549.
- [5] WAKSMANN et STARKEY. *Soil Sci.*, 1924, **17**, 373.
- [6] CHRISTENSEN. *Zentralbl. Bakt. II*, 1915, **43**, 1.
- [7] WINOGRADSKY. *C. R. Acad. Sci.*, 1924, **179**, 861.
- [8] WAKSMANN. *Soil Sci.*, 1922, **14**, 283.
- [9] WAKSMANN et DUBOS. *C. R. Acad. Sci.*, 1927, **185**, 1226.
- [10] TCHAN. *C. R. Soc. de Biol.*, 1945, novembre.

RECHERCHES SUR LA NUTRITION CARBONÉE DES AZOTOBACTER

par J. POCHON et Y. T. TCHAN (*).

(Institut Pasteur. Garches.)

Le problème de la nutrition carbonée des *Azotobacter*, qui a suscité un nombre considérable de travaux, est encore loin d'être résolu [1]. Une liste très longue de corps ternaires utilisables par ces microorganismes, en l'absence d'azote combiné, a pu être dressée et le rapport de l'azote moléculaire fixé, au carbone consommé, a pu être déterminé pour chacun d'eux, avec des variantes assez importantes suivant les auteurs, et à des taux divers suivant les modalités expérimentales.

Parmi ces corps ternaires, les uns provoquent une pullulation abondante des *Azotobacter*, les autres des cultures assez maigres. Or, les premiers, qui paraissent *a priori* les plus favorables, sont essentiellement des sucres (hexoses) et des alcools (éthylique, mannitol) dont le rôle, dans le sol, doit être minime ; trop facilement attaquables, ils sont la proie, en présence de traces d'azote assimilable, des germes banaux, à culture plus rapide que celle des *Azotobacter*. Une réserve peut cependant être faite en ce qui concerne l'alcool éthylique auquel Winogradsky [2] fait jouer un rôle important car il s'agit d'un produit banal de fermentations multiples qui peuvent avoir leur siège dans le sol. Les substances ternaires du second type, auquel nous avons fait allusion, sont également des produits de fermentation : sels d'acides gras volatils (acétique, butyrique) et fixes (lactique, tartrique, benzoïque, ...); mais il faut bien reconnaître que si leur ubiquité est un argument important en faveur de leur utilisation dans le sol, leur faible efficacité au point de vue de la prolifération enlève à cet argument une partie de sa valeur.

Les techniques mises en œuvre pour juger de l'utilisation possible d'un élément ternaire par les *Azotobacter* et du rendement de celui-ci fournissent des résultats possibles de nombreuses critiques. Rappelons que les cultures en milieu liquide sont à proscrire formellement ; que l'examen microscopique direct

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 7 février 1946.

ne se prête pas à des mesures quantitatives, que la culture sur plaques de silico-gel est de beaucoup la technique la plus favorable, mais que Winogradsky fait observer que l'interpolation des résultats obtenus sur ce milieu aux cultures sur terre moulée et dans le sol lui-même est, jusqu'à un certain point, hasardeuse.

Nous avons repris cette étude comparativement sur plaques de silico-gel et sur plaques de terre moulée car, à notre connaissance, cette dernière méthode n'avait guère été utilisée que pour les aliments éminemment favorables (mannitol, sucres...) dont nous avons déjà dit le caractère en quelque sorte « artificiel », peu susceptibles qu'ils sont de jouer un rôle, hors du laboratoire, dans la nature.

Nos expériences ont porté sur des sucres (glucose, saccharose, arabinose, lactose, amidon, inuline), des alcools (éthylique, butylique, mannitol), des acides volatils (acétique, butyrique), des acides fixes (benzoïque, lactique, succinique, oxalique, tartrique, pyruvique).

Les cultures sur plaques de silico-gel (sans azote, l'élément ternaire étant seul ajouté au liquide salin de Winogradsky et l'ensemencement étant fait avec des grains de terre) ont entièrement confirmé les résultats observés par les divers auteurs et, en particulier, n'ont fait que reproduire le travail de Winogradsky [3]. Un point important à noter cependant est la très belle prolifération obtenue avec l'acide pyruvique (sel de sodium), qui n'avait pas encore été essayé, à notre connaissance, bien supérieure à celle observée avec les autres acides fixes et les acides volatils, et même avec l'alcool éthylique, en tout point comparable à celle obtenue avec le mannitol. Or il s'agit là d'un corps intermédiaire formé au cours de très nombreuses fermentations, produit d'hydrolyse enzymatique de nombreux sucres et à la base de synthèses biologiques multiples.

Mais ce sont les cultures sur plaques de terre moulée qui nous ont donné les résultats les plus intéressants. La terre utilisée a été choisie particulièrement pauvre en azote combiné (moins de 1 p. 1.000) afin d'avoir des résultats aussi nets que possible. Elle a été enrichie par addition de l'élément ternaire à l'étude et placée à l'étuve à 30°, sans ensemencement, avec sa flore naturelle.

Contrairement à notre attente, tous les corps ternaires qui avaient permis une culture sur plaque de silico-gel ne l'ont pas permis sur terre ; seuls ceux qui permettaient une culture luxuriante se sont montrés utilisables dans la terre ; à savoir : mannitol, glucose, saccharose, amidon, acide pyruvique et alcool éthylique ; l'acide benzoïque et le lactose n'ont donné que de maigres colonies. Tous les autres corps essayés, et en particu-

lier les acides acétique et butyrique, n'ont amené aucune prolifération d'*Azotobacter*. La remarque de Winogradsky, citée plus haut, prend ici toute sa valeur, et il n'est pas toujours possible de conclure du silico-gel à la terre moulée.

L'apparition de colonies sur plaque de terre moulée étant une méthode moins sensible que l'examen microscopique direct, nous avons pratiqué cet examen sur nos plaques ; il a été entièrement négatif, sauf pour l'acide benzoïque avec lequel il semble y avoir une légère prolifération par rapport aux plaques témoins sans addition d'aliments ternaires. D'ailleurs Winogradsky [4] avait incidemment noté l'échec des cultures sur terre après addition de sels d'acides fixes et volatils.

Nous avons vérifié le fait sur trois autres échantillons de terre. Dans les limites de ces expériences, il s'est montré constant.

Nous avons ensuite essayé de voir s'il existait réellement un facteur inhibiteur dans la terre. Dans ce but nous avons fait un extrait aqueux des terres en expérience et nous l'avons ajouté au liquide salin servant à imprégner les plaques de silico-gel.

1 kilogramme de terre ; 1 litre d'eau ; vingt-quatre heures à la glacière ; filtration sur papier. On recueille 300 cm³ de filtrat. On le concentre à 170 cm³ (à 45°). On ajoute respectivement 0-10-17 cm³ de filtrat à de petites plaques de silico-gel au mannitol, à l'acide butyrique, à l'acide benzoïque. Les résultats sont résumés ainsi, les signes + et — indiquant la présence ou l'absence de culture :

	EXTRAIT DE TERRE		
	0 cm ³	10 cm ³	17 cm ³
Mannitol	++	++	++
Acide benzoïque.	+	+	—
Acide butyrique.	+	—	—

A dose suffisante, l'extrait aqueux de terre inhibe donc complètement la culture de l'*Azotobacter* sur plaque de silico-gel à l'acide butyrique et à l'acide benzoïque (sur ce dernier l'inhibition est plus difficile que sur le premier).

Nous avons tenté d'aller plus loin et de préciser quelle était, dans l'extrait de terre, la fraction active.

L'extrait est préparé de la même façon que précédemment :

1^o Une portion est précipitée par l'alcool éthylique (à 90°, vol. égal). Le filtrat est distillé sous vide pour éliminer l'alcool. C'est la fraction A.

2^o Le précipité est remis en suspension. On distille sous vide pour éliminer l'alcool. C'est la fraction P.

3^o Une portion de l'extrait est absorbé par du charbon actif. C'est la fraction C.

4^o Une portion est chauffée pendant vingt minutes à 120°. C'est la fraction T.

Ces différentes fractions sont respectivement ajoutées aux plaques de silico-gel, comme précédemment.

Les résultats sont résumés ainsi :

	FRACTION			
	A	P	C	T
Mannitol	++	++	++	++
Benzoate de soude. . . .	+	+	++	+
Butyrate de calcium. . .	+	-	+	+

D'une part, ces résultats confirment ceux de l'expérience précédente : Il existe un pouvoir inhibiteur dans la terre, qui passe en solution aqueuse. Ce pouvoir inhibiteur se manifeste surtout vis-à-vis de la culture où l'élément ternaire est peu favorable sur plaque au silico-gel. D'autre part, les divers fractionnements ne permettent guère de fixer avec précision la fraction contenant la substance inhibitrice ; il semble cependant que la fraction insoluble dans l'alcool soit la plus active et que l'absorption du filtrat sur charbon actif enlève à l'extrait une partie de son pouvoir inhibiteur, enfin que la substance soit assez thermolabile. Il ne nous a pas été possible jusqu'à présent de préciser davantage ses caractères et sa nature.

D'ailleurs ces faits sont à rapprocher de ceux déjà signalés par l'un de nous [5]. L'hyposulfite de sodium est nettement inhibiteur des *Azotobacter* en présence de certains aliments ternaires ; par exemple, en présence de thyosulfate, si la culture avec le mannitol est normale, avec l'alcool elle est retardée de trois ou quatre jours et avec l'acide succinique elle est le plus souvent nulle, même après un ensemencement massif.

Quoi qu'il en soit du mécanisme d'action, le fait en lui-même reste et nous l'avons vérifié sur trois échantillons de terre.

Puis, sur plaque de terre moulée, nous avons étudié systématiquement l'utilisation d'un certain nombre d'éléments ternaires susceptibles de se trouver dans le sol. Seuls l'acide pyruvique, l'alcool éthylique et l'acide benzoïque ont donné lieu à une pululation d'*Azotobacter* : alors que les acides acétique, butyrique, lactique, succinique, tartrique, oxalique... n'ont permis aucune culture ; des champignons seuls sont apparus tardivement.

Nous pensons donc que, contrairement à l'opinion émise par certains auteurs et contrairement aux conclusions que l'on croyait pouvoir tirer de l'étude faite au moyen des plaques de silico-gel, les acides acétique et butyrique, en particulier, ne peuvent être considérés comme des aliments énergétiques pour les *Azotobacter* dans le sol. Par contre, l'alcool éthylique garde toute sa valeur et nos expériences mettent en évidence l'intérêt de l'acide pyruvique qui, aussi bien sur plaques de terre moulée que sur plaques

de silico-gel, amène une prolifération abondante des *Azotobacter*.

Il nous semble donc qu'il faille lui faire jouer un rôle de premier plan dans le mécanisme si complexe de la nutrition carbonée des fixateurs d'azote aérobies non symbiotiques.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] POCHON (J.), *Ann. Ferment.* 1946.
- [2] WINOGRADSKY (S.), ces *Annales*, 1928, **42**, 36.
- [3] WINOGRADSKY (S.), ces *Annales*, 1931, **47**, 89.
- [4] WINOGRADSKY (S.), ces *Annales*, 1926, **40**, 455.
- [5] TCHAN (Y.-T.), *Thèse doct. ès sciences*, Paris, 1945.

ESSAIS DE DISSOCIATION ET DE SELECTION DE *PENICILLIUM NOTATUM*

par H. VELU, J. COMANDON, P. de FONBRUNE, M. JANOT,
H. PENAU, J. MAINIL, G. BOUET. (*).

Au début des recherches sur la pénicilline, l'emploi de milieux peu favorables ne permettait guère la détection de souches actives et celle de Fleming était considérée comme douée d'une activité biochimique particulière, exceptionnelle (1, 2).

Dès 1932 cependant, Clutterbuck et ses collaborateurs (1) constataient que la souche de Fleming avait tendance, au cours des repiquages, à devenir moins verte, à donner des plaques blanches, à prendre un aspect floconneux avec diminution de l'activité bactériostatique. D'où leurs essais de réobtention par la technique de la spore unique, de cultures vertes, à revers colorés, productrices de pénicilline.

En 1942, Mac Kee et Rake (3) isolaient encore à partir de colonies morphologiquement différentes d'une même souche, cinq lignées d'activités inégales.

L'amélioration des milieux de culture allait permettre par ailleurs de réviser l'opinion sur le caractère exceptionnel de la souche de Fleming.

En 1942, Wilkins et Harris (4), par exemple, montrent que 40 p. 100 des *Aspergilli* et 25 p. 100 des *Penicillia* présentent une activité bactériostatique. Kocholaty (5) isole 5 souches actives.

On en connaît actuellement plusieurs, très actives parmi lesquelles :

La souche 4222 de l'Institut Lister, celle de Fleming.

La souche 1249 B. 21 des N. R. R. L. de Peoria isolée de la souche de Fleming.

*La souche 832 des N. R. R. L. : *P. notatum*.*

*La souche 1978 : *P. notatum*.*

*La souche 1951 : *P. chrysogenum*.*

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 7 février 1946.

(1) P. W. CLUTTERBUCK et collaborateurs, *Biochem. J.*, 1932, **26**, 1907.

(2) R.-G. REID, *J. Bact.*, 1935, **29**, 215.

(3) MAC KEE et G. RAKE, *J. Bact.*, 1942, **43**, 645.

(4) W.-H. WILKINS et G.-M. HARRIS, *Brit. J. Exp. Path.*, 1942, **23**, 166.

(5) W. KOCHOLATY, *J. Bact.*, 1942, **43**, octobre.

Le désir d'améliorer les rendements d'une part, celui d'éviter la variabilité et l'instabilité des souches signalées par Clutterbuck d'autre part, ont continué de provoquer des recherches en vue de l'obtention de souches à grande activité.

C'est dans ce but que Foster (6) et ses collaborateurs ont effectué en 1943, des isolements de colonies obtenues en nappes.

En 1944, les recherches de Coghill (7) et de ses collaborateurs ont encore porté sur 241 échantillons dont 189 isolés de sources naturelles, les autres provenant de souches de collection. Tous, sauf 24 ont donné de la pénicilline. Pas une souche naturelle ne s'est révélée supérieure à la souche 1249 B. 21 pour la production en surface. Un quart a donné en surface des rendements égaux ou supérieurs à la souche 832. Plusieurs se sont montrés comparables à cette souche en culture profonde et quelques-unes supérieures.

Même les souches sélectionnées considérées comme les meilleures, la 1249 B. 21 par exemple, montrent une instabilité et une tendance fâcheuse au pléomorphisme qui rendent indispensables et continuels les efforts de sélection.

Au moment où nous avons entrepris nos recherches, nous ignorions les travaux américains et anglais postérieurs à 1940, notamment ceux de Mac Kee et Rake, de Wilkins et Harris, Foster et ses collaborateurs, etc.

Elles ont porté surtout sur la dissociation de souches actives. Nos essais de détection de souches nouvelles, nous en ont fait découvrir une seule d'assez grande activité, dans une saumure.

DISSOCIATION DE SOUCHES ACTIVES.

Nos recherches sur la dissociation des souches de *Penicillium notatum* ont eu comme point de départ les observations faites par l'un de nous sur *Eremothecium ashbyii* (8) ainsi que les constatations suivantes :

1° L'apparition sur les voiles de *cultures secondaires blanches*, cotonneuses, très éloignées du type classique et signalées comme inaptes à la production de la pénicilline par Clutterbuck, Lowell et Raistrick.

2° L'existence de colonies identiques dans les cultures en tubes, sur moût gélosé, âgées d'une vingtaine de jours et conservées à la température du laboratoire, après leur sporulation à l'étuve à 24°.

(6) J.-W. FOSTER et collaborateurs, *J. Bact.*, 1943, **46**, 421-443.

(7) R. D. COGHLIL et collaborateurs, *J. Bact.*, 1944, **46**, 639-659.

(8) G. ARRAGON, J. MAINIL, R. REFAIT et H. VELU, *C. R. Acad. Sci.*, 1945, **220**, 65.

3° La dissociation régulière des souches sur *milieu de Sabouraud* en colonies de teintes différentes nettement caractérisées.

Ainsi, d'emblée, se révélaient deux facteurs de variation :

a) Le milieu de culture d'une part ;

b) La durée et les conditions d'incubation, d'autre part.

Constatation capitale en ce qui concerne la conservation des races types de *Penicillium notatum* et dont nous allions nous inspirer :

a) Pour tenter d'obtenir des souches actives, par dissociation, d'abord par la méthode des dilutions, ensuite par isolement de spores au micromanipulateur.

b) Pour essayer de préciser les meilleures conditions de conservation de ces souches.

Nous n'étudierons ici que le premier point.

I. — DISSOCIATION PAR DILUTION.

Notre premier essai de dissociation a porté sur la souche 4222 ; à partir de spores sur moût issues d'un voile sur milieu de Challinor (9) non homogène, bleu, taché de blanc, essayé par la méthode classique des dilutions. Nous avons obtenu 4 variétés, toutes à revers blanc, sans diffusion de pigment dans le substrat :

a) Une variété verte.

b) Une variété vert bleu sombre.

c) Une variété vert bleu clair

d) Une variété blanche.

Les colonies vertes (couleur 330 du code de Klingsieck) sont de teinte uniforme, homogène, non marginées.

Les colonies vert bleu sombre (367 du code de Klingsieck) VB + 367) sont limitées par une auréole blanche discrète qui se teinte par la suite.

Les colonies vert bleu clair (372 du code de Klingsieck) (VB — 372) sont entourées d'une couronne blanche très large et persistante.

Enfin les colonies blanches pléomorphiques offrent un aspect cotonneux très particulier qui les différencie nettement. Elles sporulent mal.

Après repiquage sur gélose de Gorodkowa et ensemencement sur milieu de Challinor, l'activité de ces souches a été la suivante (10) :

(9) S.-H. CHALLINOR et J.-Mac NAUGHTON, *J. Path. a. Bact.*, 1943, 55, 441.

(10) exprimée en unités brutes sans application d'un facteur de correction. Nous regrettons que le manque d'étaillon international de travail ne nous ait pas permis de comparer nos résultats avec ceux des techniciens de langue anglaise.

	PREMIER essai	DEUXIÈME essai
Variété verte	1 U	0
Variété vert bleu foncé	6	10
Variété vert bleu clair	2	6
Variété blanche	0	0
Souche d'origine	4 à 6 U	0

Encouragés par ces premiers résultats, nous avons étendu nos recherches aux diverses souches de *P. notatum* en notre possession, dont l'origine et la parenté avec la souche de Fleming nous étaient tout à fait inconnues ; le tableau suivant indique l'activité bactériostatique maxima, en milieu de Challinor des variantes obtenues :

SOUCHE	VERTE	VERT-BLEU-FONCÉ	VERT-BLEU-CLAIR
4222	1	10	6
I. P.	»	6	3
Esp.	»	10	12
R. P.	»	8	»
Pen.	»	12	12
R. P. B.	»	10	8
Oxf.	»	6	1

Le type blanc cotonneux, pléomorphe dominant, sans activité bactériostatique, d'obtention malheureusement trop fréquente et trop facile à partir de tous les échantillons, n'a pas été indiqué.

Dans l'ensemble, ces résultats n'ont pas confirmé de manière éclatante notre premier essai dans lequel les colonies vert bleu foncé s'étaient montrées nettement plus actives. C'est la raison pour laquelle nous avons pensé à serrer le problème d'un peu plus près, en ayant recours pour la dissociation des souches, non plus à la méthode par trop grossière des dilutions, surtout lorsqu'on a affaire aux conidies agglutinées de *Penicillium*, mais aux cultures monosporiques obtenues à l'aide du micromanipulateur pneumatique réalisé par l'un de nous (11, 12).

II. — DISSOCIATIONS AU MICROMANIPULATEUR.

1° Souche 4222 avec titrages sur milieu de Challinor.

Deux souches ont été choisies pour les dissociations au micromanipulateur en raison de leurs caractères bien tranchés :

a) La souche initiale 4222, tout à fait atypique sur Sabouraud, de teinte blanc grisâtre, avec de nombreuses plaques cotonneuses non sporulées, d'activité bactériostatique faible : 4 à 6 unités par centimètre cube sur milieu de Challinor.

(11) P. de FONBRUNE, Recherches et Inventions, 1937.

(12) J. COMANDON et P. de FONBRUNE, ces Annales, 1938, 60, 113.

b) Une souche provenant au cinquième passage d'une dissociation de 4222 par la méthode des dilutions ; belle nappe vert bleu foncé (367) sur Sabouraud, avec colonies secondaires blanches, cotonneuses, d'activité bactériostatique nettement plus élevée : 6 à 10 unités par centimètre cube.

Ces premiers essais de cultures monospores qui ont porté sur 3 générations, ont permis d'obtenir 3 lignées d'après l'aspect des cultures et leur morphologie, les caractères microscopiques des spores et du mycélium, l'activité bactériostatique :

a) Le premier type, *de teinte bleu vert foncé*, légèrement cotonneux, largement marginé de blanc, à plis radiés, végétation rapide, revers jaune et exsudation jaune abondante. Spores régulières sphériques, mouillables ; Hyphes régulièrement cylindriques. *Activité bactériostatique élevée*, en comparaison de la souche initiale (10 à 16 unités contre 6 à 10).

b) *Le second, blanc, très cotonneux*, surface plane, tendant à la filamentisation et à la végétation rapide, revers non colorés, exsudation peu accusée, incolore ; spores irrégulières de taille et de forme, non mouillables. Hyphes souvent boursouflés. *Activité bactériostatique nulle ou faible* (0 à 6).

c) *Le troisième, vert bleu clair*, non cotonneux, légèrement marginé de blanc, vaguement radié, végétation lente, revers jaune, exsudation peu abondante. Spores régulières, mouillables. Hyphes réguliers, fins, avec tendance à l'anastomose. *Activité bactériostatique faible ou moyenne* (1 à 10).

Notons encore que :

d) Le mélange des spores du même groupe ne semble pas avoir exercé d'influence sur l'activité bactériostatique.

e) Dès la deuxième génération, les mycéliums obtenus (56, à partir de 2 spores) l'un de type bleu vert foncé, l'autre de type vert bleu clair, ont reproduit exactement les caractères des mycéliums d'où ils étaient issus.

f) Dans un même groupe, toutes les spores, malgré l'aspect identique des cultures filles qui en proviennent *ne donnent pas la même activité biochimique*.

2° Nouvelles dissociations sur souches diverses.

Pour vérifier la valeur de ces premières constatations, nous avons poursuivi les dissociations sur diverses souches : *Penicillium notatum* 4222, N R. R. I., 832, 1978, et *Penicillium chrysogenum* 1751.

1° *Souche 4222*. — Sur des milieux divers plus favorables que le Challinor : milieux au moût et à la peptone de caséine, puis sur milieu complexe (L. T. M.) à base de lactose, d'extraits végétaux et de mélasse, nous avons poursuivi l'étude de la souche 4222.

a) Les résultats confirment nos premières conclusions : la margination blanche pléomorphique, peu sporogène, a coïncidé avec une chute d'activité biochimique (0 contre 20 à 50 pour le type normal).

b) Dès la deuxième génération, les cultures monospores non pléomorphiques donnent des colonies ayant les mêmes caractères culturaux mais d'activité très variable, de 10 à 50 unités par exemple.

c) La culture monospore permet de déceler les spores à très haute activité bactériostatique.

2^o Souche 832. — a) Après deux dissociations qui ont permis l'obtention de cultures monospores très actives, il est apparu une réduction de cette activité qui a coïncidé avec la margination large pléomorphique des cultures mères comme des cultures filles (15 à 20 unités contre 35).

b) La souche 832 a présenté selon les générations une activité plus régulière que 4222, avec cependant les mêmes variations entre les spores.

3^o Souche 1978 (premier essai). Souche très peu active, non homogène à forte tendance au pléomorphisme.

Ces premiers isolements, sur moût, ont donné des résultats aberrants sans rapport avec l'aspect des cultures sauf en ce qui concerne le *pigment diffusible*. Malgré la margination blanche constante sur toutes les cultures une seconde dissociation est effectuée.

Comme avec les souches 4222 et 832, l'activité des spores dissociées a été très variable d'une spore à l'autre.

Comparée aux cultures 4222 sur même milieu, l'activité a été considérable malgré l'existence d'une large marge blanche pléomorphe (de 40 à 80 unités).

4^o Souche 1978 B (deuxième essai). Souche très active, culture homogène. Dissociation sur Sabouraud. Titrage sur milieu L. T. M.

Les souches à large marge pléomorphe obtenues ont montré une grande activité bactériostatique presque égale à celle des souches non marginées. C'est à leur sporogénèse difficile et lente qu'il faut vraisemblablement attribuer les variations et l'irrégularité de cette activité (13).

5^o Souche *Chrysogenum* 1951. Toutes les cultures monospores identiques obtenues se sont montrées beaucoup plus actives que la culture mère témoin mais cependant très différentes les unes des autres (de 40 à 80 unités au lieu de 20).

(13) Nous n'avons pas indiqué les taux bactériostatiques qui seront donnés dans un travail ultérieur d'ensemble sur la production de la pénicilline.

CONCLUSIONS.

De ces nombreux essais, nous pouvons déduire les conclusions suivantes :

1° L'activité bactériostatique est l'apanage de certaines souches qui constituent de véritables races chimiques ; mais contrairement à ce que l'on observe avec les agents microbiens, cette activité biologique est loin d'être fixe et régulière : elle peut s'exalter, diminuer, et même presque disparaître.

2° Comme il est de règle pour beaucoup de champignons, et comme l'a montré récemment l'un de nous pour *Eremothecium ashbyii* (14) il est possible de dissocier ces races, soit par la vieille méthode des dilutions, soit mieux au micromanipulateur pneumatique, en plusieurs types assez nettement caractérisés.

3° Le milieu semble combattre ou au contraire faciliter la disjonction des types.

4° Le pléomorphisme retentit dans certains cas sur la sécrétion, peut-être indirectement, en ralentissant ou en supprimant la sporogénèse. Il apparaît comme difficilement reversible. La margination marque souvent le premier pas vers le pléomorphisme.

5° L'activité bactériostatique est liée dans une certaine mesure avec les caractères culturaux de ces variantes : aspect et coloration des cultures et des revers, margination des colonies isolées, rapidité de la végétation et de la sporulation, sécrétion de pigment diffusible (15).

6° Pour une souche donnée, elle varie avec les cultures de même âge obtenues à partir de la souche initiale puis, toujours par culture monospore, d'une génération à l'autre, dans chacune des lignées : les individus ainsi obtenus doivent se répartir au point de vue de l'activité suivant une courbe en cloche plus ou moins étalée dont il serait intéressant de préciser la forme.

7° En raison de la tendance à la dissociation et des variations de l'activité bactériostatique de *Penicillium notatum*, les cultures monospores à partir de souches sélectionnées semblent indispensables, à chaque génération, pour augmenter les probabilités d'obtention de spores à grande potentialité biochimique.

En attendant le moment de leur utilisation, ces cultures monospores doivent être mises à l'abri de toutes les causes de variation grâce à l'emploi de méthodes de conservation convenables, par exemple en ampoules scellées sous azote des spores désséchées sous vide moléculaire après congélation.

(14) G. ARRAGON, J. MAINIL, R. REFAIT et H. VELU, *C. R. Acad. Sci.*, 1945, 220, 65.

(15) L'étude cytologique de ces variantes a été entreprise par Mlle Delaporte et M. Saccas.

CONTRIBUTION AU DIAGNOSTIC ET AU TRAITEMENT DE LA FIÈVRE RÉCURRENTE À SPIROCHAETA DUTTONI DANS L'AGGLOMÉRATION DE DAKAR

par H. BOIRON.

(*Institut Pasteur de l'A. O. F. Dakar.*)

La fièvre récurrente à tiques n'est pas rare à Dakar. Le nombre de cas dont nous avons eu connaissance s'élève en effet à 205 pour une période de trois années :

1942.	112 cas (28 eurocéens et 84 indigènes).
1943.	30 cas (15 européens et 15 indigènes).
1944.	63 cas (27 européens et 36 indigènes).

Bien heureusement, cette affection ne se termine que très exceptionnellement par la mort. Il n'en demeure pas moins qu'elle doit être considérée comme grave si l'on tient compte des manifestations pénibles qui l'accompagnent, de la fréquence des séquelles qu'elle entraîne et de la lenteur parfois considérable du retour à la guérison. D'où l'intérêt d'un diagnostic précoce, si toutefois existe un mode de traitement capable de stériliser rapidement l'organisme et d'arrêter la maladie dans son évolution. Au cours de cette étude, notre but sera, d'une part, d'apporter quelques éléments susceptibles de faciliter le diagnostic, en outre, d'indiquer un mode de traitement qui nous a paru supérieur à ceux préconisés jusqu'ici.

*
* *

Il est classique de distinguer une récurrente sanguine et une récurrente méningée. Pour certains auteurs, il n'existe pas de récurrente à spirochète de Dutton sans réaction méningée. Gallais, faisant sienne l'opinion émise par Remlinger et Bailly, pense que « l'atteinte méningée est non une complication, mais une détermination presque obligatoire de la maladie ». Gonnet paraît être du même avis. Il semble bien, en effet, que les malades présentent, dès le début de l'affection, un syndrome méningé mineur que seule une recherche systématique peut mettre en évidence ; puis le spirochète envahit le névraxe ; il crée alors la

méningo-encéphalite qui ne doit pas non plus être considérée comme une complication, mais comme un stade plus avancé de la maladie. Ce stade encéphalo-méningé est appelé « récurrente méningée », expression impropre puisque tout le névraxe participe au processus et que l'atteinte méningée existait dès le début de la maladie. Dans ces conditions, il nous paraît plus rationnel de distinguer, dans l'étude clinique de la fièvre récurrente à tiques, une période de début et un stade encéphalo-méningé.

La forme de début est la plus fréquemment rencontrée, du moins chez l'indigène. Elle débute brutalement par des frissons et une hyperthermie à 40° s'accompagnant de céphalée violente à type frontal. Parfois l'accès dure seulement quelques heures et la défervescence s'accompagne alors d'une transpiration abondante. Il semble que la guérison puisse survenir après cet unique accès, à type pseudo-palustre, et en l'absence de tout traitement. Mathis, Durieux et Advier, au cours d'expériences de transmission à l'homme de *Spirochæta duttoni* par piqûres de tiques infectées, ont démontré l'existence de ces cas avortés qui, dans la pratique, ne sont jamais diagnostiqués. Quelquefois l'hyperthermie se prolonge une semaine entre 38° et 38°5. Le plus souvent, la fièvre persiste au-dessus de 39° pendant trente-six à quarante-huit heures, puis la chute thermique se produit et le malade s'éveille apyrétique le matin du troisième jour. On croit la guérison prochaine ; cependant il persiste un état saburrel marqué des voies digestives avec nausées et quelquefois vomissements ; le malade est subictérique ; son foie est généralement un peu gros et sensible ; la constipation est habituelle ; une albuminurie légère (10 à 20 centigrammes) n'est pas rare. Et surtout le malade se plaint ; il accuse d'abord cette céphalée frontale, plus précisément périorbitaire, qui persiste après la défervescence et malgré les analgésiques ; il signale également courbatures, douleurs lombaires, myalgies. Devant un tel tableau clinique, en vérité assez imprécis, la pensée doit être attirée vers la possibilité d'une récurrente. L'interrogatoire et un examen attentif du système nerveux permettront alors, le plus souvent, de révéler quelques anomalies discrètes : mouches volantes, sensations vertigineuses fréquentes, légère raideur de la nuque observée au cours de la flexion passive de la tête, parésies et légers troubles des réflexes au niveau des membres inférieurs.

L'examen direct du sang, recueilli au cours de la poussée fébrile, montre des spirochètes dans 20 p. 100 des cas environ. L'inoculation de quelques gouttes de sang, prélevé même après la défervescence, infecte à coup sûr le rat blanc ou la souris blanche ; mais le spirochète n'apparaît dans le sang de l'animal qu'au bout de cinq à six jours et quelquefois plus. La ponction lombaire n'a pas été pratiquée à cette période.

L'apyraxie dure, totale, de huit à douze jours en moyenne. Pendant cette période le malade est asthénique ; il souffre toujours de la tête ; son teint est terne. Dans les cas favorables apparaît alors, calqué sur le premier, un second clocher bientôt suivi d'une nouvelle défervescence ; et l'alternance de brèves périodes fébriles et de phases apyrétiques d'une durée de huit à quinze jours permet de faire le diagnostic.

Mais il n'en est pas toujours ainsi. L'atteinte encéphalo-méningée peut en effet apparaître très précocement, soit au cours de la première poussée fébrile, soit deux ou trois jours après le début de la première période d'apyrexie ; généralement elle se produit trois semaines environ après le début du premier accès de fièvre. Les signes habituels, à ce stade de la maladie, sont les suivants : le malade est lucide, quelquefois un peu obnubilé ; il est couché en chien de fusil, accuse une céphalée frontale ou occipitale toujours très violente, et présente des nausées, des vomissements, de la constipation et des troubles sensitifs ; la température demeure entre 37°5 et 38°5 ; le pouls est ralenti ; le signe de Kernig existe mais rarement très marqué ; les troubles des réflexes sont variables mais constants ; les parésies des membres inférieurs sont fréquentes ; enfin on note souvent un ptosis léger et parfois une paralysie de la convergence.

Lorsque la méningo-encéphalite fait suite à une ou plusieurs récurrences, sa nature ne fait guère de doute ; lorsqu'elle se manifeste au cours du premier accès de fièvre, il n'en est pas de même. C'est ici que l'examen du liquide céphalo-rachidien recueilli *dans les premiers jours de l'atteinte encéphalo-méningée*, donne des indications précieuses. L'inoculation de ce liquide permet de porter un diagnostic ferme ; mais le spirochète n'apparaît qu'après un délai variable (de trois à dix-neuf jours) dans le sang de la souris blanche. Or, les troubles subjectifs, nous l'avons vu, sont très importants. La ponction lombaire calme assez souvent les céphalées, mais pour peu de temps ; et elle ne peut être répétée chaque jour sans inconveniient. Un traitement efficace doit être mis en œuvre immédiatement ; c'est pourquoi le diagnostic de la nature de la méningo-encéphalite présente un intérêt de premier ordre. L'examen soigneux du liquide céphalo-rachidien nous permet de porter ce diagnostic en vingt-quatre heures, avec de bonnes chances de succès.

Depuis le début de nos recherches, nous avons examiné dans ces conditions 42 liquides qui ont infecté la souris. En dehors de la recherche microscopique des spirochètes et de l'inoculation, cet examen comporte la numération et la formule cytologique des éléments blancs, le dosage de l'albumine, le Bordet-Wassermann et le Kahn, le benjoin colloïdal.

Dans tous les cas, le liquide céphalo-rachidien s'est montré limpide ou à peine opalescent, et la recherche microscopique des spirochètes est demeurée négative. Chez trente-neuf malades, nous avons noté une teneur élevée en albumine (0,40 g. à 1 g.) et une importante réaction cellulaire (200 à 400 éléments en moyenne), les limites extrêmes étant respectivement 58 et plus de 500 cellules. La formule cytologique du liquide est caractérisée par une lymphocytose prédominante (80 p. 100 en moyenne de lymphocytes et 20 p. 100 de polynucléaires ou de poly-

nucléaires et de monocytes). Dans tous les cas, les réactions de Bordet-Wassermann et de Kahn se sont montrées négatives. La réaction du benjoin colloïdal n'a pu être pratiquée que sur vingt-cinq liquides : dans treize cas la précipitation a été obtenue dans la zone syphilitique, la zone méningitique demeurant muette ; douze fois la réaction est demeurée négative.

Dans un cas l'albuminorachie était normale (0,22 g.), mais toutes les autres réponses concordaient avec l'inoculation positive : cinquante-huit éléments, BW et Kahn négatifs, benjoin 222200021000000.0. Chez les deux derniers malades observés, l'examen du liquide s'est trouvé en contradiction avec le résultat positif de l'inoculation : pour l'un : quatre éléments, 0,22 d'albumine, BW et Kahn négatifs, benjoin non pratiqué ; pour l'autre : trois éléments, 0,22 d'albumine, BW et Kahn négatifs, benjoin 00000022000000.0.

Ainsi donc l'examen du liquide céphalo-rachidien peut permettre de réunir un faisceau de signes qui, s'ils sont constatés simultanément, constituent une forte présomption en faveur de la fièvre récurrente et doivent, à notre avis, déclencher la sanction thérapeutique. Ces signes sont les suivants :

- a) Liquide clair ;
- b) Réaction cellulaire importante et formule cytologique bizarree ;
- c) Taux d'albumine élevé ;
- d) Réactions de Bordet-Wassermann et de Kahn négatives ;
- e) Benjoin colloïdal négatif ou positif dans la zone syphilitique seulement.

Nous n'avons envisagé ci-dessus que les cas de récurrente cérébro-méningée confirmés (inoculation du liquide céphalo-rachidien positive). Il nous a paru intéressant de noter également les cas pour lesquels l'inoculation à la souris est demeurée négative alors que les signes cliniques de l'affection, puis l'examen du liquide, nous avaient fait porter le diagnostic de fièvre récurrente. Nous avons ainsi relevé 10 cas, tous indigènes, où, contre notre attente, les souris inoculées ne se sont pas infectées. Certes, diverses raisons peuvent être invoquées pour expliquer cette contradiction : liquide conservé dans de mauvaises conditions, malades ayant déjà reçu une ou plusieurs injections d'un produit arsenical avant la rachicentèse. Faute de renseignements précis, nous admettons tout simplement que les données fournies par l'examen du liquide céphalo-rachidien permettent, trois fois sur quatre environ (trente-neuf fois sur cinquante-deux dans notre statistique), de porter rapidement et à bon escient le diagnostic de méningo-encéphalite récurrentielle.

*
* *

De nombreux produits médicamenteux ont été utilisés dans le traitement de la fièvre récurrente, qu'il s'agisse de récurrente

mondiale ou de récurrente à tiques. Les sels d'antimoine, les sels de bismuth, les sels d'or ont peu de partisans. La plupart des arsenicaux successivement essayés (atoxyl, hectine, 606, 914, galyl, ludyl, olarsol, luargol, acétylarsan, stovarsol, sulfarsénol, etc.) ont eu chacun leur heure de succès. Actuellement, trois d'entre eux sont encore utilisés de façon courante ; ce sont deux produits trivalents (novarsénobenzol et sulfarsénol) et un pentavalent (acétylarsan). Ces composés passent pour donner de bons résultats dans la récurrente à poux. Il n'en est pas toujours de même dans les récurrentes à tiques. En Afrique Occidentale Française en particulier, les échecs thérapeutiques sont nombreux. D'une part, le traitement arsenical doit être suffisamment énergique et prolongé pour éviter les rechutes qui, malgré cette précaution, ne sont pas rares ; en outre l'invasion du névraxé se produit quelquefois malgré le traitement, qu'elle apparaisse à la suite de la première injection médicamenteuse ou en fin de série. En effet, l'acétylarsan et le sulfarsénol ne possèdent pas, semble-t-il, de propriétés spirillicides suffisantes ; quant au novarsénobenzol, et même au sulfarsénol, on a pu leur reprocher de déclencher l'apparition des phénomènes méningés ; ce n'est pas démontré ; mais il est certain, en tout cas, que le néosalvarsan et ses dérivés sont sans action sur les syndromes cérébro-méningés, faiblesse qui a son importance lorsqu'on connaît l'affinité de *Spirochæta duttoni* pour les centres nerveux.

Dans ces conditions il importait de trouver un produit susceptible d'agir sur le parasite, qu'il ait ou non franchi la barrière méningée et par conséquent sûrement incapable de favoriser l'évolution de la maladie vers la phase encéphalo-méningée. Dans le traitement de la trypanosomiase, ce but a été atteint par l'utilisation, soit de synergies médicamenteuses (moranyl-tryparsamide ou moranyl-orsanine), soit de l'orsanine ou du trypoxyl suivis d'une série de tryparsamide, soit de l'orsanine seule qui est employée avec succès tant dans les formes lymphatico-sanguines que dans les formes nerveuses *au début de leur évolution*. L'un de ces trois modes de traitement méritait d'être essayé dans le traitement de la fièvre récurrente.

Nous nous sommes adressé à l'orsanine sodique (270 Fourneau) avec laquelle nous avons traité, en 1942, sept formes de début de fièvre récurrente. La stérilisation rapide et définitive de la circulation périphérique, la disparition des troubles en vingt-quatre à quarante-huit heures, nous ont incité à poursuivre dans cette voie. En 1943, nous avons soigné et guéri, par la même méthode, 8 nouveaux cas de fièvre récurrente à leur période de début ; nous avons également attaqué à l'orsanine 2 cas de récurrente encéphalo-méningée avec l'intention de compléter le traitement par quelques injections de tryparsamide ; à notre satis-

saction, l'orsanine seule s'est révélée efficace et a permis la guérison des deux malades. A l'heure actuelle, notre statistique comporte 33 cas que nous allons examiner de plus près et à propos desquels nous indiquerons la méthode que nous utilisons pour le traitement et son contrôle, ainsi que les résultats que nous avons obtenus.

Le diagnostic positif a été porté, soit de façon formelle par la mise en évidence du spirochète (examen microscopique ou inoculation), soit avec les meilleures garanties par l'examen du liquide céphalo-rachidien. Alors se pose l'indication de l'orsanine qui réclame un assez bon état général, l'intégrité du fond d'œil, une tension artérielle et une azotémie sensiblement normales ; une faible dose d'albumine dans les urines n'est pas une contre-indication mais demande une surveillance particulière. L'orsanine est utilisée en solution au 1/10 dans l'eau distillée ; la solution est préparée au moment de l'emploi ; l'injection, faite profondément sous la peau du flanc, est peu douloureuse. L'orsanine provoque fréquemment des nausées et des vomissements ; c'est la première injection qui entraîne les troubles digestifs les plus marqués, les injections suivantes étant mieux tolérées. Aussi nous commençons maintenant par l'injection préparante d'une dose minime d'orsanine (10 à 20 cg.) suivie, le lendemain même, de la dose thérapeutique suffisante (2 cg. par kilogramme de poids). Cette dose utile est répétée une fois cinq jours plus tard dans les formes de début ; les formes nerveuses exigent un total de trois à quatre injections séparées les unes des autres par le même intervalle de cinq jours. Le malade doit, de préférence, être à jeun le matin de la piqûre ; il absorbe 1 g. d'hyposulfite de soude en solution le jour même et le lendemain de chaque injection arsenicale.

Les 33 cas de fièvre récurrente que nous avons traités par l'orsanine ont tous été confirmés par l'inoculation ; ils comprennent 20 cas à la phase de début et 13 cas au stade encéphalo-méningé.

Les 20 récurrentes à la phase septicémique intéressent 5 Européens et 15 indigènes. La guérison des 5 Européens a été obtenue rapidement et définitivement. Sur les 15 indigènes, 13 ont également guéri rapidement ; le quatorzième, Y. D... (cas n° 19) a fait une poussée fébrile transitoire seize jours après la fin du traitement, puis tout est rentré dans l'ordre sans nouvelle injection médicamenteuse ; mais les inoculations pratiquées avec le sang prélevé sur Y. D... trente et quarante-cinq jours après la fin du traitement, ont permis d'infecter la souris ; sans qu'aucun traitement complémentaire ait été institué, les inoculations pratiquées les soixantième et soixantequinzième jours sont demeurées négatives et Y. D... n'a présenté aucune manifestation

pathologique durant les six mois pendant lesquels il a été suivi. Le quinzième cas concerne un tirailleur, G. T... (cas n° 22) qui, présentant un accès de fièvre treize jours après la fin du traitement, a été aussitôt soumis, par un confrère, à une cure d'acétylarsan.

Les 13 cas traités au stade nerveux intéressent 12 Européens et 1 indigène. Dans 2 cas (cas n°s 26 et 27), les malades, apparemment guéris par le traitement à l'orsanine, ont rapidement quitté l'A. O. F. et ont été perdus de vue ; ils ne doivent pas entrer en compte. Sur les 11 cas que nous avons pu suivre, nous enregistrons 7 succès complets, 3 échecs certains et 1 succès douteux. Les 3 échecs concernent, en premier lieu, un sous-officier infirmier (cas n° 29) que l'orsanine a seulement amélioré, et qui a présenté, quelques semaines après la cure, une rechute que la tryparsamide semble pour le moment avoir jugulée ; en second lieu, un religieux (cas n° 30) qui a mal toléré l'orsanine et chez lequel les signes méningés n'ont en aucune façon été amendés par le traitement ; le troisième insuccès concerne un tirailleur, D. D... (cas n° 31) qui présentait une forme nerveuse compliquée d'irido-choroidite ; après échec d'une série d'acétylarsan, le malade a été repris à l'orsanine sans plus de succès ; après quoi la pénicilline (1.800.000 unités), puis un traitement combiné pénicilline-orsanine ont été essayés ; le malade n'a tiré aucun bénéfice de ces cures diverses ; l'examen direct du sang montrait encore des spirochètes et les troubles oculaires persistaient. Enfin nous signalons comme succès douteux le cas d'un jeune garçon (cas n° 18) chez lequel apparut, un mois environ après la fin du traitement, une réaction méningée qui dura vingt-quatre heures et céda spontanément.

*
**

Nous avons indiqué plus haut que nous éliminions de notre statistique deux malades qui avaient quitté Dakar dès la fin de leur traitement, et qu'en l'absence de nouvelles sur leur état, nous ne pouvions considérer comme définitivement guéris. Quand pouvons-nous donc parler de guérison ? Ce contrôle de guérison, nous le basons d'abord sur la surveillance clinique des malades pendant un minimum de deux mois après leur guérison apparente, en outre, sur le résultat de deux inoculations de sang à la souris, la première dix jours et la seconde un mois après la dernière injection médicamenteuse. Nous avons rarement pu pratiquer, après la guérison clinique, une inoculation de liquide céphalo-rachidien à l'animal, car les malades, une fois leurs troubles disparus, refusent généralement la ponction lombaire. Parmi les 25 malades guéris par l'orsanine, 7 ont pu être suivis deux mois ; 8 ont été revus de trois à six mois, et 8 également de six mois

à un an après le traitement ; le vingt-quatrième est venu nous revoir avant son départ : il était guéri depuis quinze mois ; enfin le dernier, préparateur à l'Institut Pasteur de Dakar, est actuellement guéri depuis trente et un mois.

L'inoculation à l'animal pratiquée dix jours, puis un mois après la fin du traitement, constitue le meilleur test de guérison de la fièvre récurrente ; elle ne nous a jamais fait défaut. Mais en cas d'échec du traitement, une réponse positive obtenue quarante à cinquante jours après la dernière injection médicamenteuse, est malheureusement trop tardive. Nous espérons pouvoir trouver un autre test susceptible de fournir une réponse plus rapide.

*
* *

En résumé, début brutal par frissons, fièvre à 40° et violente céphalée frontale, défervescence du troisième jour mais persistance de l'état nauséux et du mal de tête, foie sensible, subictère, petits signes méningés, tels sont, à notre avis, les symptômes qui doivent alerter le praticien, et réclament à la fois examen de sang et inoculation à la souris. Troubles subjectifs intenses et contractures peu marquées, lucidité, parésies, troubles des réflexes, troubles oculaires, caractérisent la méningo-encéphalite récurrentielle qui sera confirmée par l'examen du liquide céphalo-rachidien.

Cette affection était jusqu'ici rebelle à presque toutes les thérapeutiques. L'orsanine sodique nous a donné des résultats satisfaisants ; c'est un produit actif sur le spirochète et qui peut être administré sans danger à condition d'être manié prudemment et à bon escient. Après avoir éliminé les cas douteux ou dont l'observation a été insuffisante, il résulte de nos essais que le bilan de l'orsanine dans le traitement de la fièvre récurrente à spirochète de Dutton peut être ainsi schématisé :

31 traitements. 25 guérisons (80 p. 100 de succès).

Ces traitements concernent :

20 cas au stade de début. 18 guérisons (90 p. 100 de succès).

11 cas au stade encéphalo-méningé. 7 guérisons (63 p. 100 de succès).

BIBLIOGRAPHIE

- [1] GUILLET (R.), *Bull. Soc. Path. exot.*, 1926, **19**, 860.
- [2] MATHIS (C.), DURIEUX (C.) et EWSTIFIEEFF (C.), *Bull. Soc. Path. exot.*, 1927, **20**, 441.
- [3] MATHIS (C.), *Bull. Soc. Path. exot.*, 1927, **20**, 700.
- [4] DURIEUX (C.), *Bull. Soc. Path. exot.*, 1932, **25**, 13.
- [5] FEYTE (R.), *Bull. Soc. Path. exot.*, 1932, **25**, 368.

- [6] MATHIS (C.), DURIEUX (C.) et ADVIER (M.), ces *Annales*, 1934, 52, 166.
- [7] MATHIS (C.) et DURIEUX (C.), *Bull. Acad. Méd.*, 1934, 111, 528.
- [8] MATHIS (C.) et DURIEUX (C.), *Bull. Acad. Méd.*, 1934, 111, 839.
- [9] ADVIER (M.), ALAIN (M.) et RIOU (M.), *Bull. Soc. Path. exot.*, 1934, 27, 593.
- [10] FORT (P.), BERNIER (G.) et BLANCARDI (C.), *Maroc Médical*, 1937, n° 175, 11.
- [11] LIÉGOIS (R.), PAGES (R.), DUGUET (J.) et POUHIN, *Maroc Médical*, 1938, n° 191, 191.
- [12] LODEWICKZ (A.), *Ann. Soc. Belge Méd. Trop.*, 1938, 18, 487.
- [13] ADVIER (M.), *Grandes endémies tropicales*, 1939, Vigot Frères.
- [14] DIGONNET (L.) et MATHIS (M.), *Bull. Soc. Path. exot.*, 1939, 32, 143.
- [15] GALLAIS (P.), *Médecine Tropicale*, 1942, n° 10, 801.
- [16] GONNET (Cl.), *Médecine Tropicale*, 1942, n° 10, 895.
- [17] *Rapport de l'Institut Pasteur de l'A.O.F.*, Les spirochétoses, année 1942, 23, et année 1943, 20.
- [18] PESME (J.), GONNET (Cl.) et MEAR (Y.), *Médecine Tropicale*, 1943, n° 4, 278.
- [19] BOIRON (H.), *Maroc Médical*, 1944, n° 247, 197 ; n° 249, 276 et 277.

SUR L'ACTION TRYPANOCIDE SPÉCIALE DE CERTAINS DÉRIVÉS DE LA PHÉNANTHRIDINE POUR *T. CONGOLENSE*

par L. LAUNOY et M^{me} M. PRIEUR.

Dans un mémoire récent (1) J. Carmichael et F. R. Bell étudiant au Laboratoire de Recherches Vétérinaires d'Entebbe (Uganda) l'action de certains produits sur l'affection à *T. congoense*, signalèrent les bons résultats qu'ils obtenaient pour le traitement de cette infection au moyen d'un nouveau dérivé (corps 1553) de la phénanthridine.

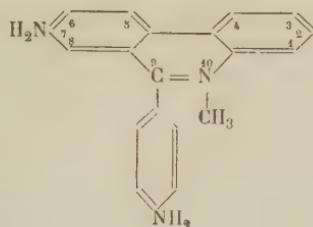
Certains dérivés de la phénanthridine avaient été fabriqués par Browning, Morgan, Robb et Walls en 1938. Etudiés par Browning (2) et ses collaborateurs en 1938, l'un des composés (S.897) se montra trypanocide à la fois sur *T. brucei* et sur *T. congoense* chez la souris, à la dose de 1 mg. pour 20 g., ce qui est près de la dose toxique. Ce composé (S. 897) fut l'objet de la part de Hornby (3) et de ses collaborateurs, en 1943, et de Carmichael et Bell (1) en 1944, d'études sur le bétail de l'Est africain. Un nouveau dérivé de la phénanthridine, le 1553, s'est montré, entre les mains de Carmichael et Bell, et sur le bétail infecté par *T. congoense*, doué d'une activité trypanocide élevée ; une dose unique de ce produit peut provoquer la stérilisation. Les expériences de ces auteurs étaient faites sur des zébus atteints d'affection chronique à *T. congoense*. La dose thérapeutique fut de 1 mg. par kilogramme de poids. Les injections étaient pratiquées par voie sous-cutanée. Nous avons reçu en 1945, des doses de S. 897 et de S. 1553 ; nous avons étudié ces composés sur la souris et le rat, infectés par différents trypanosomes (*).

Voici nos résultats :

I. — Corps S. 897 (*Exp. du 21 juin 1945 au 8 janvier 1946*).

Le composé 897 est le chlorure de 7-amino-9 (*p*-aminophényl), 10 méthylphénanthridinium, dont la formule développée est :

(*) Nous tenons ces composés du Dr A. J. EWINS, à qui nous adressons l'expression de nos vifs remerciements.



TOXICITÉ.

Les doses sont données en milligrammes (Dl 50).

α Souris, voie veineuse : 0,35 ; voie sous-cutanée : 1,5.

β Rat blanc, voie sous-cutanée : 7,5 (pour 100 g. de poids).

ACTIVITÉ TRYPANOCIDE.

A. Souris. — Les recherches ont été faites sur les espèces suivantes : *T. brucei*, *T. congolense*, *T. evansi*, *T. annamense résistant*, *T. equiperdum*.

1^o *T. brucei*. — Le traitement par voie veineuse, à la dose de 2/10 de milligramme et le traitement par voie sous-cutanée à la dose de 1 mg., sont sans résultat. Les animaux meurent en infection.

2^o *T. congolense*. — *Traitemennt par voie veineuse*. — On observe ici un blanchiment de cinq à six jours, à partir de la dose de 0,025 mg. et la stérilisation est obtenue, pour une souris de 20 g., à partir de 0,075 mg. Les parasites disparaissent en trois jours.

Après *traitement par voie sous-cutanée*, on observe le blanchiment à partir des doses de 0,05 mg. à 0,075 mg. La stérilisation est obtenue avec 0,1 mg. Dans ces expériences (juillet et fin octobre 1945), l'observation a duré plus de cent jours, les témoins mouraient entre cinq et sept jours. Nous devons ajouter toutefois qu'à côté de ces évolutions suraiguës, notre souche produisait souvent chez les témoins des maladies plus longues, parfois entrecoupées de crises. D'une façon générale, la maladie durait de quinze à trente-six jours. Ceci pour les expériences effectuées en juillet 1945. Depuis novembre 1945, le virus paraît s'être exalté à la suite de nombreux passages, et la maladie non traitée évolue, sauf exceptions rares, entre six et vingt-sept jours ; la moyenne pour 14 animaux s'établit à quatorze jours.

Chez le cobaye, la maladie avec cette souche évolue entre huit et vingt-neuf jours (d'après les résultats sur 10 animaux), la moyenne d'évolution est de seize jours.

3^o *T. evansi*. — Des expériences des 28 novembre et 5 décembre

1945, sur des souris et concernant des traitements par voie sous-cutanée, permettent de dire que jusqu'à 0,7 mg. pour 20 g., le S. 897 est sans action. Avec 1 mg., on peut observer des blanchiments de vingt-quatre heures et parfois de cinq jours, mais la rechute est régulière.

4° *T. annamense chimio-résistant.* — Un traitement par voie veineuse, avec des doses de 0,2 mg. et 0,3 mg. permet d'observer un blanchiment de vingt-quatre heures seulement. Avec la dose de 0,3 mg, nous avons obtenu exceptionnellement un blanchiment de huit jours. Dans ces expériences, les témoins mouraient en quinze jours.

B. Rats. — 1° *T. brucei.* — Sous la peau, l'injection de 0,5 mg., ou de 1 mg. provoque quelques jours de blanchiment. Avec la dose de 2,5 mg. pour 100 g. de rat, on obtient la stérilisation, les témoins de cette expérience mouraient en six jours.

2° *T. equiperdum.* — Avec 0,5 mg, on obtient déjà un blanchiment ; c'est d'ailleurs le seul résultat obtenu (blanchiment quatre jours), même avec 2,5 mg. Les doses supérieures, 5 et 7,5 mg. banchissent pendant une semaine environ ; la rechute s'observe toujours, ou bien l'animal meurt très vite, vraisemblablement par toxicité, lorsque le traitement atteint la dose de 7,5 mg.

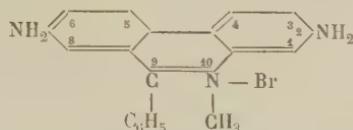
3° *T. congolense.* — Par voie sous-cutanée, et déjà à la dose de 0,5 mg, le S. 897 est actif sur la trypanosomose à *T. congolense* du rat, le blanchiment est réalisé en vingt-quatre heures et la stérilisation paraît être obtenue par cette dose (observation de soixante-dix-sept jours).

Chez le rat, notre virus détermine la mort entre trente-cinq et soixante-huit jours. Les longues survies sont caractérisées par des crises d'une durée de deux à six jours ; c'est seulement dans les dix derniers jours que la septicémie est dense et continue. Les animaux, dans ces expériences et dans celles qui suivent, étaient traités du dix-neuvième au vingt-troisième jour de leur infection, le sang étant, au moment du traitement, nettement positif. Certains animaux témoins ont présenté une infection chronique pouvant dépasser quatre-vingt-dix jours ; ils mouraient en infection sanguine dense.

II. — Corps S. 1553

(Exp. du 18 septembre 1945 au 20 février 1946).

Le corps S. 1553 est le bromure de diamino-2-7-phényl 9-méthyl-10-phénanthridinium (nous le désignons comme bromure de dimidium). Sa formule développée est :



TOXICITÉ.

Les doses sont données en milligrammes, comme précédemment.

α Souris, voie veineuse : 0,75 ; voie sous-cutanée : 1 mg. pour 20 g.

β Rat, voie sous-cutanée : entre 7,5 mg. et 10 mg. pour 100 g.

ACTIVITÉ TRYPANOCIDE.

A. Souris. — 1^o *T. brucei*. — Le traitement par *voie veineuse* ne permet d'observer aucune action, même avec la dose de 0,5 mg. Avec celle de 0,75 mg., on obtient un blanchiment de vingt-quatre heures.

1 mg., injecté par voie sous-cutanée, reste sans action.

2^o *T. congolense*. — Par la *voie veineuse*, on observe déjà du blanchiment à partir de 0,05 mg. et parfois, mais rarement, on peut obtenir la stérilisation. Même résultat avec 0,075 mg. C'est à partir de 0,25 mg. que la stérilisation est la règle (observation de quatre-vingts jours).

Par la voie *sous-cutanée*, la dose de 0,05 mg. produit le blanchiment habituel et parfois la stérilisation. Avec 0,075 mg. la stérilisation est régulière (expériences des 28 septembre et 24 octobre 1945). L'activité par la voie sous-cutanée, est plus grande que par la voie veineuse. Les souris guéries par la dose de 0,1 mg. de S. 1553 ne sont pas réfractaires à une seconde inoculation pratiquée vingt jours après le traitement.

3^o *T. evansi* et *T. annamense* chimio-résistant. — Les recherches sur ces parasites, aux doses de 1 mg. par voie sous-cutanée, pour *T. evansi* et aux doses de 2/10, 3/10 et 4/10 de milligramme par voie veineuse pour *T. annamense* chimio-résistant ne donnent aucun résultat positif.

B. Rat. — 1^o *T. brucei*. — Par voie *sous-cutanée*. Avec 0,5 mg. on a pu noter deux stérilisations sur trois (quatre-vingt-un jours d'observation). Avec les doses supérieures, on observe la stérilisation régulière.

2^o *T. equiperdum*. — Par voie *sous-cutanée*, et jusqu'à 1 mg. compris, pas de blanchiment ; avec 2,5 mg. blanchiment de cinq jours. Les doses plus élevées ne donnent pas de meilleurs résultats et sont toxiques.

Mêmes résultats avec *T. evansi*.

3° *T. congolense*. — Par voie *sous-cutanée*. Les doses de 0,1 mg., 0,25 mg. et 0,5 mg. ont été stérilisantes (observation de quarante-trois et quarante-sept jours le 2 avril 1946).

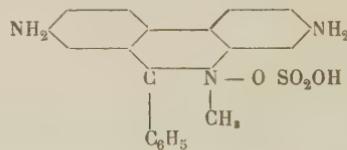
C. Cobaye. — *Action sur T. congolense*. — Les doses de 0,05 mg., 0,1 mg. blanchissent pendant douze à seize jours. A partir de 0,25 mg. (pour 100 g.) l'injection étant sous-cutanée, le blanchiment est acquis pour au moins quarante-deux jours (4 avril 1946).

Les animaux témoins infectés en même temps que les animaux des essais présentaient le dixième jour après l'infection un sang grouillant de parasites. Ils ont succombé en trente-cinq et trente-six jours.

III. — Sulfate acide de dimidium.

Toutes les doses de ce corps sont exprimées en bromure (Exp. du 28 novembre 1945 au 23 février 1946).

Au cours de la préparation du bromure de dimidium, on passe par un corps intermédiaire qui est le sulfate acide de dimidium, dont formule ci-dessous.



Ce corps donne une solution acide qui, neutralisée par l'éthanamine et employée contre les infections trypaniques expérimentales de la souris et du rat, donne les résultats suivants :

TOXICITÉ.

A. Souris. — Par voie *veineuse*, la dose de survie 60 p. 100 est égale à 0,7 mg. Par voie *sous-cutanée*, la dose de survie 100 p. 100 est égale à 1 mg. Avec 1,5 mg., on obtient encore 33 p. 100 de survie.

1° *Activité trypanocide sur T. congolense*. — Par la voie *veineuse*, la dose active débute à 0,025 mg.

Par la voie *sous-cutanée*, la stérilisation débute à 0,025 mg ; cependant avec 0,075 mg. nous avons enregistré une rechute tardive (vingt-trois jours). Quand nous parlons de stérilisation, nous fondons notre opinion sur des observations poursuivies pendant au moins cent jours (au 18 mars 1946) ; les animaux ont été sacrifiés à cette date.

2^o Sur *T. brucei*, *T. evansi* et *T. equiperdum*, aucune action digne d'être notée, que le traitement soit appliqué par voie sous-cutanée ou par voie veineuse. Nous n'avons pas dépassé 0,1 mg. pour 20 g. de souris.

B. Rat. — La mort est obtenue entre 5 mg. et 7 mg. pour 100 g., par voie sous-cutanée.

Activité trypanocide. — Sur le Nagana expérimental à *T. brucei* du rat, il faut atteindre 2,5 mg. pour 100 g., pour avoir la stérilisation ; dans 50 p. 100 des cas et même avec cette dose, on peut observer parfois une rechute tardive (vingt et un jours). Même avec 5 mg. on peut, sept semaines après le traitement, observer une rechute.

Sur l'infection à *T. congolense*, le sulfate acide de dimidium est actif à partir de 0,1 mg. ; le blanchiment est obtenu le deuxième jour. Avec le corps 1553, le blanchiment pour cette même dose s'observait en vingt-quatre heures. A partir de 0,5 mg, le sulfate acide de dimidium blanchit en vingt-quatre heures ; la stérilisation paraît suivre, semble-t-il (observation de quarante-trois jours), une dose de 0,1 mg.

C. Cobaye (infecté par *T. congolense*). — La dose de 0,05 mg. blanchit pendant treize jours. Un animal traité par 0,1 mg. (pour 100 g.) sous la peau est toujours blanchi le trente-sixième jour (2 avril 1946).

IV. — Action préventive.

Les trois corps étudiés sont sans action préventive, pour chacun des Flagellés qui ont fait l'objet de cette étude, *T. congolense* compris.

Conclusion.

Chez la souris, le rat et le cobaye, les dérivés de la phénanthridine étudiés par nous, présentent pour *T. congolense* une affinité très particulière qui en fait, contre ce Flagellé, des agents trypanocides de valeur. Les mêmes composés sont inactifs contre *T. brucei* de la souris et légèrement actifs contre ce même parasite chez le rat.

Ils n'ont aucune action préventive contre l'infection par les différents micro-organismes étudiés, y compris *T. congolense*.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] CARMICHAEL (J.) et BELL (F. R.). *Veter. Record*, 16 décembre 1944, 56, 495.
- [2] BROWNING (C. H.), MORGAN (G. T.), ROBB (J. U.) et WALLS (L. P.). *J. Path. Bact.*, 1938, 46, 203.
- [3] HORNBY (H. E.). *J. comp. Path.*, 1943, 53, 4, 29.

Nota. — Depuis la remise de notre mémoire aux Annales de l'Institut Pasteur (10 avril 1946) nous avons pris connaissance (*British Journ. of Pharmacology and Chemotherapy*, vol. 1, n° 1, mars 1946) d'un mémoire de R. WIEN sur l'action des composés 897 et 1553 dans les infections à *T. congolense* de la souris. Nos propres conclusions sont en tous points d'accord avec celles de R. WIEN.

SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE

Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, Paris, 15^e.)

Séance du 2 mai 1946.

COMMUNICATIONS (*SUITE ET FIN*)

RECHERCHES SUR LA CHROMOGÉNÈSE DE *CLOSTRIDIUM CORALLINUM* P. ET R.

par A. R. PRÉVOT et M. RAYNAUD.

En vue d'étudier la nature et le rôle physiologique du pigment rouge (1) de *Cl. corallinum* (2), nous avons cherché à en obtenir régulièrement de grandes quantités pour l'extraire et le purifier. De nos recherches antérieures, il résultait que ce pigment ne se produit pas en anaérobiose stricte, fait paradoxalement puisque *Cl. corallinum* est justement un anaérobie strict ; il fallait donc trouver une méthode pour obvier à cette difficulté technique.

En bouillon VF glucosé à 2 p. 1000 réparti en tubes de Hall sans bille, le pigment apparaît vers le huitième jour en quantité modérée qui n'augmente plus après le douzième-quinzième jour. L'addition au bouillon de petites quantités d'aneurine ou d'acide indolacétique augmente légèrement la chromogénèse ; il en est de même pour l'addition d'indol ; mais ces gains sont trop faibles pour être exploités. L'addition de solution de Lugol est déjà plus intéressante : 1 cm³ par tube de Hall permet l'apparition du pigment à partir du cinquième jour avec un maximum au huitième assez intense ; à noter en passant, l'extraordinaire résistance des anaérobies à l'iode. Parmi les métaux oligodynamiques, employés à doses très faibles (1 à 100 γ par tube), certains ont une action favorisante modérée : manganèse, cobalt, nickel, zinc, cérium, antimoine. D'autres au contraire ont une action intense : apparition du pigment dès le troisième jour, maximum au cinquième jour permettant des récoltes abondantes : uranium, titane, lanthane et cadmium ; il faut employer 5 γ des trois premiers, alors que le cadmium sous forme de chlorure agit à la dose de 1 γ.

(1) Nous avions proposé à tort pour ce pigment le nom de « coralline ». Ce terme étant employé pour un corps chimique défini, nous renonçons à son emploi et nous proposons celui de « coral'inine ».

(2) Ces *Annales*, 1944, 70, 182 et 185.

Les métaux suivants : fer, cuivre, magnésium, argent, mercure, plomb, or et platine n'empêchent pas la croissance mais inhibent totalement la chromogénèse.

Les actions combinées nous ont fourni de bons résultats avec les trois associations suivantes : indol + uranium ; indol + manganèse ; indol + cadmium.

Mais les résultats ci-dessus exposés, obtenus en tubes de Hall, ne sont pas transposables de façon régulière en récipients de grande taille. Nous avons donc dû examiner l'influence de la forme du récipient sur la chromogénèse. Des cultures comparées :

- 1^o en tubes profonds de capacité utile inférieure ou égale à 500 cm³ ;
- 2^o en fioles d'Erlenmeier de 750 cm³ ;
- 3^o en flacons cylindriques de 1, 2 et 3 litres ;
- 4^o en fioles plates, modèle diptérie, de 1 litre ;
- 5^o en ballons sphériques de 1 litre contenant 600 cm³ de bouillon

nous ont montré que la chromogénèse était maximum dans les flacons dont la surface de réoxydation était la plus grande, à condition toutefois qu'elle permette un départ de l'anaérobiose aussitôt après la désaération par ébullition. Les flacons les meilleurs sont donc : le flacon plat modèle diptérie et le ballon sphérique rempli jusqu'au diamètre maximum. Le premier d'entre eux a cependant un inconvénient : les cultures y sont irrégulières. Au contraire le ballon sphérique donne des départs très réguliers, une chromogénèse intense à partir du huitième jour, maximum du douzième au quinzième. L'addition des substances favorisantes ci-dessus étudiées a diminué le temps de formation du pigment et augmenté le rendement ; mais nous les avons avantageusement remplacées par l'addition d'hydroperoxydes, 24 heures après le départ de l'anaérobiose, alors que la culture est déjà très abondante. L'eau oxygénée donne d'assez bons résultats, l'hydroperoxyde d'isopropyle donne des résultats encore meilleurs, mais c'est l'hydroperoxyde d'éthyle (3) employé à raison de 5 cm³ de la solution N/10 pour un ballon de 600 cm³, qui donne la chromogénèse la plus régulière, la plus rapide et la plus intense et permet les récoltes les plus abondantes.

CONCLUSIONS. — De ces recherches, il apparaît :

1^o Que la corallinine est le résultat d'une oxydation intracellulaire secondaire lente d'une substance incolore qui se produit préalablement en anaérobiose stricte dans les corps microbiens au cours des premières heures.

2^o Cette oxydation secondaire est favorisée par les métaux oligodynamiques dont les plus actifs sont : l'uranium, le titane, le lanthane et le cadmium, ce dernier étant le plus actif de tous.

3^o Elle est surtout favorisée par les hydroperoxydes, dont les plus actifs sont les hydroperoxydes d'éthyle et d'isopropyle.

4^o La surface de réoxydation secondaire joue un rôle de premier plan et c'est dans les ballons sphériques oxydés secondairement par l'hydroperoxyde d'éthyle qu'on obtient les récoltes les plus abondantes.

(*Institut Pasteur — Service de Anaérobies.*)

(3) Ces substances ont été préparées par le professeur MAX JAYLE que nous remercions très vivement de cette aide.

**ETUDE D'UNE VARIETE DE *DIALISTER PNEUMOSINTES*
ISOLEE D'UNE SEPTICEMIE MORTELLE
AVEC ABCÈS DU POUMON ET DU CERVEAU**

par A. R. PRÉVOT en M. RAYNAUD.

Dans un cas de septicémie survenue chez un homme de 43 ans, à la suite d'un abcès du poumon consécutif à une pleurésie purulente, nous avons isolé à plusieurs reprises un anaérobiose strict se présentant comme une variété de *Dialister pneumosintes*. Cet anaérobiose a été trouvé dans le sang par hémoculture au moment d'un des accès fébriles se reproduisant tous les 40 jours, dans le pus d'un abcès du cerveau métastatique en association avec *Streptococcus intermedius* P et enfin dans le pus de l'abcès du poumon. Après un certain nombre d'accès fébriles à période régulière (1), la cachexie s'installa et la mort survint après deux ans de maladie.

Morphologiquement cette souche est absolument semblable aux descriptions classiques de *D. pneumosintes* (2) : très petit bâtonnet Gram-négatif à la limite de la visibilité. Examiné à l'ultramicroscope, on constate une amplitude très marquée et une rapidité très vive des mouvements browniens. Les éléments sont lancés en éclair dans toutes les directions avec une grande irrégularité, mais sans jamais montrer la moindre mobilité vraie. D'ailleurs aucune coloration n'a révélé de ciliature. L'isolement n'a pu être obtenu que sur gélose profonde additionnée de sérum frais inactivé de lapin. Les subcultures n'ont pu être obtenues au début que sur bouillon additionné d'extrait de cervelle. Par la suite nous avons pu l'entretenir sur bouillon VF glucosé + sérum en anaérobiose stricte. En pratiquant les repiquages tous les mois, nous avons pu conserver cette souche pendant un an. Un chauffage de 30 minutes à 56° ne le tue pas. Mais il meurt à 70°.

Le caractère cultural qui différencie le plus notre souche de l'espèce normale est la forme des colonies en gélose profonde au sérum : celles-ci sont ouatées, translucides, de petite taille.

La gélatine au sérum est liquéfiée après 48 heures. Le lait additionné de sérum est coagulé en 48 heures. Les protéines coagulées (blanc d'oeuf, sérum, fibrine) ne sont pas attaquées.

Les glucides suivants sont fermentés sans production de gaz : glucose, lévulose, maltose, galactose, lactose et arabinose.

Le nitrate de sodium n'est pas réduit en nitrite. La phénosafranine est réduite, de même que le rouge neutre, mais la safranine n'est pas décolorée.

(1) L'observation complète de ce cas, relatée par MM. RENÉ MARTIN, GUILLAUME et SUREAU, paraîtra ultérieurement. Nous remercions vivement ces auteurs de nous avoir fourni ce matériel.

(2) Voir « Les Microbes Anaérobies » WEINBERG, NATIVELLE, PRÉVOT, Masson, édit., Paris, 1937, 740.

La fermentation du bouillon VF glucosé à 1 p. 100, en présence d'extrait de cervelle ou de sérum frais inactivé a donné les produits suivants : acidité volatile totale 0,033 g. p. 100, consistant en acides butyrique et acétique dans la proportion de une partie du premier pour huit du second ; acide lactique ; un peu d'ammoniaque. Pas d'indol ni de scatol, ni de SH², ni d'amines volatiles, ni d'aldehyde, ni d'alcool, ni de cétone, ni d'acétylméthylcarbinol.

Les cultures sont dépourvues de pouvoir pathogène pour les animaux de laboratoire ; ce fait pose une fois de plus le problème des microbes certainement pathogènes pour l'homme et dont on ne connaît pas l'animal réceptif, ni le mode d'inoculation.

Par injections répétées de corps microbiens dans la veine d'un lapin nous avons préparé un sérum agglutinant la souche homologue au 1/200.

Cette observation a quelque analogie avec le cas récemment publié par Magrassi (3). Il s'agissait d'une femme de 26 ans qui présenta une fièvre intermittente avec poussée à 39-41° survenant toutes les sept semaines et ayant abouti à la mort en dix-huit mois. Toutes les hémodcultures pratiquées au cours des accès fébriles furent positives en anaérobiose stricte dans les milieux additionnés d'albumine stérile non chauffée. Ce germe se conserve bien en bouillon additionné d'extrait de cervelle et se révèle après un certain temps comme un anaérobiose micro-aérophile que l'auteur a identifié à *Dialister granuliformans*, espèce très voisine de *D. pneumosintes*. A l'autopsie on trouva une endocardite ulcérovégétante, mais aucun des microbes causant habituellement cette lésion n'a été isolé.

Position dans la systématique. — Notre souche n'appartient pas à l'espèce *D. granuliformans* comme celle de Magrassi, car elle ne donne pas de culture granuleuse et reste définitivement anaérobiose stricte. Elle se rapproche au contraire de *D. pneumosintes* dont elle ne diffère essentiellement que par les colonies ouatées transparentes en gélose profonde. Nous la considérons donc comme une variété de *D. pneumosintes* et son étude nous a permis de préciser plusieurs caractères culturaux et biochimiques de cette espèce, qui jusqu'ici n'avaient pas été étudiés.

(Institut Pasteur. Service des Anaérobies.)

COMPARAISON DE LA GELOSE AU VERT BRILLANT (KAUFFMANN) ET DE LA GELOSE S. S.

par F. ROLAND.

L'efficacité des milieux sélectifs au vert brillant pour l'isolement des Salmonelles est bien connue à l'heure actuelle.

Ayant pu avoir un peu d'un des derniers milieux sélectifs : la

(3) MAGRASSI, *Boll. Ist. Sierot. Milan.*, 1944, 33, 185.

gélose S. S. (*Salmonella-Shigella*) [Laboratoire Difco] (1) nous avons pensé comparer les résultats obtenus par les ensemencements de selles de malades atteints de troubles intestinaux sur ce milieu et sur le milieu de Kauffmann.

La gélose S. S. présente cette particularité de contenir deux substances inhibitrices :

- le désoxycholate de soude comme dans le milieu de Leifson (2) ;
- le vert brillant comme dans le milieu de Kauffmann (3).

La formule de la gélose S. S. est la suivante :

Extrait de bœuf	5 g.
Peptone protéose Difco	5 g.
Lactose	10 g.
Sels biliaires spéciaux	8,5 g.
Citrate de soude	8,5 g.
Hyposulfite de soude	8,5 g.
Citrate de fer	1 g.
Vert brillant	0,33 mg.
Rouge neutre	0,025 g.
Gélose	13,5 g.
Eau distillée	4.000 cm ³

La dose de vert brillant employée est environ 20 fois plus faible que celle dont on se sert pour préparer le milieu de Kauffmann. Les sels biliaires spéciaux contiennent le désoxycholate de soude.

Comme nous ne pouvons à l'heure actuelle nous procurer ce milieu sous forme déshydratée, ni nous procurer ces sels biliaires spéciaux, nous avons modifié cette formule et nous employons du désoxycholate de soude à la dose de 2 g. p. 1000 à la place des sels biliaires. L'extrait de bœuf est remplacé par du bouillon de viande ordinaire.

Préparation du milieu modifié par nous. — Un bouillon de viande peptoné, gélosé et ajusté à pH 7 est précipité 25 minutes à 118°. Au sortir de l'autoclave on filtre, on ajoute les différents composants et on ramène au volume primitif avec de l'eau distillée. On vérifie le pH à 7. On répartit 200 cm³ dans des ballons à fond plat et on stérilise à 115° pendant 10 minutes. Ces ballons sont conservés de préférence à la glacière. Au moment de l'emploi on fait fondre le milieu au bain-marie bouillant et on répartit en boîtes de Pétri stériles.

Nous voulons attirer l'attention sur plusieurs points importants.

Le rouge neutre étant détruit à la lumière il faut conserver les ballons et les boîtes de Petri à l'obscurité. Cet indicateur de réaction exige une attente de 24 heures pour que les bacilles isolés donnent une réponse nette sur l'attaque ou non du lactose.

Ce milieu à base de désoxycholate de soude a tendance à être humide lorsqu'il est récemment préparé ; si l'ensemencement est pratiqué peu après la préparation du milieu, il faut le faire sécher à l'étuve à 37° sinon on s'expose à avoir une nappe de colonies confluentes impossible à reprendre.

(1) DIFCO MANUAL, 7^e édition, 1944.

(2) E. LEIFSON, *J. Path. a. Bact.*, 1935, 40, 1, 581.

(3) F. KAUFFMANN, *Zeitschr. Hyg. u. Infektionskr.*, 1937, 119, 233.

Le désoxycholate de soude forme autour des colonies de bacilles attaquant le lactose un précipité granuleux à l'intérieur de la gélose. Ce précipité ne gêne pas l'observation des colonies translucides qui peuvent se développer autour des colonies rouges. Il est difficile d'obvier à cet inconvénient et pour éviter ce précipité les auteurs américains emploient justement ces sels biliaires spéciaux.

Les bacilles attaquant le lactose donnent dès colonies rouges. Les bacilles sans action sur le lactose se développent en formant des colonies incolores translucides. Les bactéries produisant de l'H₂S donnent des colonies qui après 24 heures, ont un centre noir. Ce milieu est très inhibiteur pour le bacille *Proteus* qui ne donne que quelques colonies bien isolées et non envahissantes.

Nous avons comparé ce milieu ainsi préparé au milieu de Kauffmann. Sur 50 examens de selles nous avons obtenu les résultats :

MICROBES ISOLÉS	MILIEU de Kauffmann	MILIEU de S. S.
Négatif dans les deux milieux	35	35
Bacille d'Eberlh.	4	4
Bacille paratyphique A	1	1
Bacille paratyphique B	4	4
Bacille de Shiga	0	1
Bacille de Flexner.	0	4
<i>B. feca/is alcaligenes</i>	0	1
Examens positifs.	9	15

Les bacilles typhiques ont été isolés chez des malades à la période d'état de fièvre typhoïde. Le bacille paratyphique A chez un porteur de germes. Les bacilles paratyphyques B chez des malades hospitalisés pour fièvre typhoïde. Le bacille de Shiga chez un homme présentant un syndrome dysentérique avec présence de glaires dans les selles. Les bacilles de Flexner chez des malades ayant un syndrome dysentérique avec présence de sang dans les selles (il faut remarquer que deux de ces selles nous sont parvenues 48 heures après le prélèvement).

Nous pouvons conclure de ces examens que :

Les bacilles du genre *Salmonella* sont isolés aussi facilement sur les deux milieux.

Les deux milieux inhibent pareillement le bacille *Proteus*.

Alors que les bacilles dysentériques sont inhibés par le milieu de Kauffmann [le fait a déjà été noté par Sohier (4)] ils se développent sur le milieu S. S.

Nous pensons que le milieu S. S. qui présente les mêmes avantages que le milieu de Kauffmann pour l'isolement des *Salmonellae* et pour l'inhibition du *Proteus* mais qui n'inhibe pas le développement des bacilles dysentériques doit être choisi de préférence si l'on emploie un seul milieu d'isolement.

(Institut Pasteur. Service du Docteur Dumas.)

(4) R. SOHIER, J. GRÉGOIRE, G. RAULIN, R. BETHOUX, ces *Annales*, 1945, 72, 671.

CONTRIBUTION A LA CLASSIFICATION SEROLOGIQUE DES BACILLES DE LA TUBERCULOSE AVIAIRE

par F. ROTACH.

Les recherches de J. Furth [5], W. Schaefer [9], H. Harporth [7], Cabasso, Schaefer et Harporth [2] et Abel [4] ont établi que les bacilles de la tuberculose aviaire ne constituent pas un groupe sérologiquement homogène mais qu'ils se composent de différents types sérologiquement distincts. Parmi 56 souches de bacilles aviaires authentiques, W. Schaefer [9], puis Cabasso, Schaefer et Harporth [2] à l'Institut Pasteur de Paris ont identifié 27 souches appartenant à un premier type, appelé type I, et 29 souches appartenant à un autre type, appelé type II. En outre ils ont constaté qu'une souche aviaire qui leur avait été envoyée du Danemark (souche A5) et une souche d'aspect aviaire et isolée d'un cheval appartenait à des types sérologiquement distincts. Enfin un autre type sérologique apparemment saprophyte isolé du cobaye a été décrit par W. Schaefer [9] comme type III du cobaye. Dans ses caractères culturaux et biologiques ce type présente une certaine ressemblance avec les bacilles de la tuberculose aviaire, mais il est dépourvu de toute virulence pour la poule.

Nous avons repris ces recherches en employant, pour l'identification des types, d'une part la réaction de fixation du complément et d'autre part la réaction d'agglutination. Pour les réactions de fixation du complément nous avons utilisé, comme Schaefer, soit des extraits alcooliques soit des suspensions de bacilles chauffées 1 heure à 80°. Les mêmes suspensions nous ont servi pour les réactions d'agglutination, car toutes nos souches présentaient un aspect lisse sur le milieu de Loewenstein et donnaient des suspensions suffisamment stables. Les antisérum ont été obtenus en injectant à des lapins par voie veineuse, deux fois par semaine pendant trois à quatre semaines, 4 à 8 mg. de bacilles tués. Les animaux ont été saignés six jours après la dernière injection. Ces sérum ne présentent d'emblée qu'une spécificité très faible et donnent des réactions de fixation du complément ou d'agglutination avec tous les types du groupe aviaire et même avec les bacilles bovins. Mais si on traite les sérum selon la méthode de l'absorption des anticorps de groupe par des bacilles d'une souche hétérologue, une spécificité stricte pour la souche homologue apparaît. Pour cette absorption nous avons employé la même technique que Schaefer, mais en effectuant l'absorption avec des quantités de corps bacillaires plus grandes (200 mg. pour 10 cm³ de sérum dilué 1 : 10).

Il ressort de nos expériences que sur 23 souches examinées, 12 appartenaient au type I et 10 au type II de Schaefer. La souche d'un bacille aviaire isolée d'une poule tuberculeuse (souche av. 514) ne correspondait cependant à aucun de ces types. Elle fournissait un anti-sérum qui, après absorption par une souche hétérologue, s'est montré spécifique pour la souche homologue. Le tableau I montre les résultats des réactions de fixation du complément de ce sérum avec les corps

bacillaires de la souche homologue, avec ceux des deux autres types et ceux du saprophyte du cobaye susmentionné, appelé type III cobaye.

Le tableau montre que ce sérum, à l'état non absorbé, réagit avec tous les types du groupe aviaire et avec le type III cobaye. Mais après absorption par les souches hétérologues il présente une spécificité nette pour la souche homologue. Alors que les anticorps de groupe sont absorbés facilement, nous n'avons pas réussi à absorber les anticorps spécifiques pour la souche homologue dans ce sérum en employant la technique ci-dessus décrite (tableau I, colonne D).

TABLEAU I. — Sérum antiaviaire 514 (Fixation du complément).

SÉRUM	SUSPENSIONS BACILLAIRES			
	Aviaire 514	Aviaire type I	Aviaire type II	Type III, cobaye
A) Non absorbé	1 : 250	1 : 120	1 : 250	1 : 50
B) Absorbé type I	1 : 50	0	0	0
C) Absorbé type II	1 : 250	1 : 20	0	0
D) Absorbé aviaire 514 . .	1 : 80	0	0	0
E) Abs. type III, cobaye.	1 : 250	0	0	0

Il s'agit donc d'un nouveau type sérologique de bacilles aviaires authentiques. Ce nouveau type se distingue non seulement des types I et II, trouvés le plus fréquemment à l'Institut Pasteur, mais aussi de deux autres types, que Cabasso, Schaefer et Harpoth [2] ont décrits ultérieurement et dont ils n'ont eu qu'un seul représentant. Malheureusement, ces souches n'ont pas été conservées vivantes. Mais en nous servant d'un sérum préparé en 1938 par W. Schaefer avec la souche A5 provenant du Danemark et des corps bacillaires desséchés de l'autre souche d'aspect aviaire et isolée d'un cheval, nous avons pu constater que ces souches n'appartiennent pas au nouveau type que nous venons de décrire. Nous connaissons donc actuellement parmi les souches aviaires trouvées dans la maladie spontanée des oiseaux, quatre types distincts qui sont bien caractérisés par leurs propriétés sérologiques. Sans doute ce nombre représente-t-il un minimum, et il est possible qu'on complète cette classification par d'autres types après des recherches plus étendues.

Les auteurs qui se sont occupés de la classification des bacilles aviaires, ayant employé, soit la réaction de fixation du complément Furth [5], Schaefer [9], soit la réaction d'agglutination Chiti [3], Abel [1]. Harpoth [7], il nous a paru intéressant de comparer ces deux techniques. D'une manière générale nous avons constaté que les sérum antiaviaires de lapins agglutinent jusqu'à des dilutions plus étendues que celles qui fixent le complément en présence des suspensions bacillaires. Mais à part cette différence quantitative, les résultats fournis par les deux méthodes sont tout à fait comparables.

Dans le tableau II nous donnons les résultats des agglutinations obtenues avec le sérum antiaviaire 514 non absorbé et absorbé par les souches hétérologues aviaires et par une souche bovine et humaine.

Nous avons employé comme antigène, à côté des trois types aviaires, une suspension d'une souche bovine lisse.

TABLEAU II. — Sérum antiaviaire 514 (Agglutination).

SÉRUM	SUSPENSIONS BACILLAIRE			
	Aviaire 514	Aviaire type I	Aviaire type II	Bovin (taureau)
A) Non absorbé	1 : 1 280	1 : 160	1 : 320	1 : 320
B) Absorbé type I.	1 : 1 280	0	0	0
C) Absorbé type II	1 : 1 280	0	0	0
D) Absorbé bovin (Vallée).	1 : 640	1 : 80	1 : 320	1 : 10
E) Absorbé humain (H 215)	1 : 640	1 : 80	1 : 320	0

Ce sérum montre une certaine spécificité pour la souche homologue déjà à l'état non absorbé, mais il agglutine aussi les autres types aviaires et même la souche bovine. Cette agglutination non spécifique disparaît complètement après absorption du sérum par un type aviaire hétérologue tandis que tous les types aviaires sont encore agglutinés après absorption par des corps bacillaires d'une souche humaine ou bovine.

Il existe donc dans les bacilles aviaires un antigène commun à tous les types aviaires qui manque aux bacilles tuberculeux des mammifères. Cet antigène commun n'est pourtant pas strictement spécifique pour les bacilles aviaires, car il existe également dans le bacille saprophyte du cobaye (type III cobaye). En effet, ce type absorbe tous les anticorps dans les sérum antiaviaires sauf les anticorps spécifiques du type et inversement l'antisérum préparé avec ce type, réagit avec tous les types aviaires, même après absorption par des bacilles bovins ou humains. L'antigène dominant et vraiment caractéristique des bacilles aviaires est donc l'antigène spécifique de chaque type et il est nécessaire de disposer de sérum spécifiques pour chaque type pour identifier les souches aviaires au moyen de la méthode sérologique.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] ABEL (G.). *Zentralbl. Bakt.*, 1939, **145**, 126.
- [2] CABASSO (V.), SCHAEFER (W.) et HARPOTH. *C. R. Soc. Biol.*, 1939, **131**, 969.
- [3] CHITI (G.). *Zentralbl. Bakt.*, 1938, **142**, 303.
- [4] EBINA (T.). *Zentralbl. Bakt.*, 1940, **145**, 289.
- [5] FURTH (J.). *J. Immunol.*, 1926, **12**, 273.
- [6] GRIFFITH (A. St.). *Tubercle*, juin 1925, 417.
- [7] HARPOTH (H.). *Z. Tuberk.*, 1938, **79**, 140.
- [8] KRUMMWIEDE (Ch.), COOPER (G.) et PROVOST. *J. Immunol.*, 1925, **10**, 55.
- [9] SCHAEFER (W.). *Ces Annales*, 1937, **58**, 388.
- [10] SCHAEFER (W.). *C. R. Soc. Biol.*, 1936, **121**, 1290.
- [11] SCHAEFER (W.). *C. R. Soc. Biol.*, 1935, **120**, 590.
- [12] WILSON (G. S.). *J. Path. a. Bact.*, 1925, **28**, 69.

(Institut Pasteur, Laboratoire de recherches sur la Tuberculose.)

TECHNIQUE NOUVELLE POUR L'ETUDE DES BACTERIES OXYDANT LES HYPOSULFITES DANS LE SOL

par TCHAN YAO-TSENG.

Les hyposulfites et les polythionates sont, dans le sol, les produits intermédiaires de l'oxydation du soufre élémentaire introduit comme engrais ou comme anticryptogamique, les sulfates étant le terme final de cette oxydation (1).

Il s'avère par ailleurs que ces hyposulfites et polythionates ont un effet nocif vis-à-vis des agents microbiens éminemment utiles que sont les fixateurs d'azote, les nitrifiants, et les cellulolytiques (2). Il est donc du plus haut intérêt de connaître la flore bactérienne qui les élimine en les amenant sous forme d'oxydation maxima du soufre, les sulfates étant inversement très favorables tant au point de vue de la nutrition des végétaux qu'à celui de la mobilisation de certains éléments fertilisants.

La méthode que nous avons mise au point est basée sur les principes suivants :

Toute culture d'enrichissement préalable est à éviter car elle fausse le « panorama » microbien du sol. Il n'en est pas de même des milieux liquides : le sol est un milieu discontinu ; nous devons tenter de le reproduire aussi fidèlement que possible et en particulier éviter les conditions artificielles d'oxydo-réductions qu'engendre un milieu liquide, même en couche mince. La libre concurrence entre les formes existant dans le sol doit être respectée et rendue possible dans les limites où la sélectivité du milieu le permettra. Cette sélectivité devra être obtenue non par des procédés artificiels mais par la réalisation de conditions de nutrition bien particulières. Celles-ci seront faciles à imaginer étant donné qu'il s'agit de germes autotrophes. L'oxydation de l'hyposulfite (à l'exclusion de toute autre forme de soufre) sera la seule source d'énergie rendant possible l'utilisation du C minéral introduit. L'azote sera par ailleurs fourni sous forme ammoniacale.

Voici la technique que nous préconisons :

Comme pour toutes les études de microbiologie du sol nous utilisons silice-gel comme support solide de notre milieu. La solution nutritive est composée de :

A. Phosphate monopotassique	1,00 g.
Chlorure de magnésium	0,42
Chlorure de sodium	0,50
FeCl ₂ 4 H ₂ O	0,015
MnCl ₂ 4 H ₂ O	0,015
Eau distillée	Q. S. p. 100 cm ³
B. PO ₄ HNa NH ₄ 4 H ₂ O	1,2 p. 100 cm ³
C. Hyposulfite de sodium	N/10
D. Carbonate de calcium	10 g. p. 100 cm ³

(1) GUITTONNEAU et KEILING, *Ann. Agron.*, 1933, 2, 690.

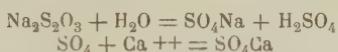
(2) Y. T. TCHAN, *Thèse de Doctorat*, 1945.

Tout le S du milieu est donné pratiquement sous la forme d'hyposulfite et seuls, les microorganismes capables de l'utiliser s'y développent. Le pH est à 7,1 (nous l'avons contrôlé avec une électrode de verre). Pour une plaque de 20 cm. de diamètre on utilise 10 cm³ de (A), 5 cm³ de (B), 5 cm³ de (C) et 5 cm³ de (D). Pour une plaque de 10 cm. de diamètre on prend des doses cinq fois moindres.

On stérilise (A) et (D) à 120° C pendant vingt minutes, (B) et (C) sont stérilisés par filtration. Les plaques sont stérilisées par irradiation à l'ultra-violet (3). On projette les solutions (A), (B) et (C) sur la surface du gel. On sèche jusqu'à ce que la surface soit mate. Ensuite, on projette la suspension (D) et on sèche de nouveau. Il faut prendre les précautions d'aseptie nécessaires (3).

Les ensemencements soit, par des grains de terre, soit par un poids connu de terre en poussière, sont applicables (4). Pour isolement des souches pures on peut utiliser la dilution successive.

L'oxydation des hyposulfites peut donner des sulfates.



Au fur et à mesure que l'oxydation avance la couche de calcaire se transforme en sulfate de Ca et l'émail devient transparent. Dans d'autres cas il change simplement de coloration, allant du jaune au rouge brique. Ces indices nous montrent l'activité des micro-organismes sur nos plaques. Le calcaire joue un rôle double de tampon et d'indicateur du développement de ces micro-organismes.

Les épreuves chimiques complètent l'étude physiologique de ces germes.

a) Prélever un peu de gel avec un fil de platine flambé. Déposer sur ce gel une goutte d'une solution d'I N/100 et une goutte d'empois d'amidon. Si le grain reste bleu, on n'a plus d'hyposulfite dans le gel.

b) Prélever un peu de calcaire autour d'un grain de terre jugé intéressant. Le laver avec un peu d'eau distillée dans un tube à essais. Laisser déposer le calcaire. Coulter le long du tube avec une pipette Pasteur une solution de chlorure de Ba à 10 p. 100. La présence de sulfate est indiquée par la formation d'un précipité.

DISCUSSION :

Dès le début de cette étude, nous nous sommes demandé si nous aurions avantage à employer la gélose à cause de sa préparation plus facile et plus commode. Plusieurs essais nous en ont montré les inconvénients.

D'abord, quand on ramène le pH du milieu vers la neutralité, les phosphates précipitent. Leur incorporation à la gélose trouble l'observation, car ces précipités forment des taches plus ou moins grandes qui ressemblent étrangement aux colonies bactériennes. La présence de calcaire rend les observations difficiles.

On peut remplacer le calcaire par un mélange de bicarbonate de Na

(3) Y. T. TCHAN, ces Annales, 1945, 71, 313.

(4) WINOGRADSKY, ces Annales, 1932, 48, 89.

et de chlorure de Ca. Les plaques obtenues avec ce milieu sont transparentes, légèrement tachetées. Les colonies se détachent mal sur ce fond grisâtre et l'observation reste difficile.

Le calcaire rend la surface du gel opaque et blanche. L'observation devient alors facile. Ce calcaire nous permet également de réaliser un milieu de culture qui se rapproche davantage des conditions naturelles du sol.

(Il est nécessaire de prendre des précautions d'aseptie en raison de la contamination de l'eau par les thio-bacilles. Si l'on n'utilise pas les solutions et les plaques stériles, on n'obtient pas de résultats sûrs).

(Institut Pasteur de Garches.)

Les communications suivantes paraîtront en *Mémoires* dans les *Annales de l'Institut Pasteur*.

Recherches immunochimiques sur la Bactéridie charbonneuse.

VII. Utilisation d'études quantitatives pour suivre l'épuisement d'un immunosérum par un mélange d'antigènes, par M^{me} Anne-Marie STAUB et M. Pierre GRABAR.

Etude histologique des lésions des glandes salivaires observées chez quelques espèces de campagnols appartenant aux genres *Microtus* et *Evotomys*, par M^{me} J. RAYNAUD et M. A. RAYNAUD.

A propos de la synergie des anticorps, par M^{les} M. GUILLAINIE, A. KREGUER et M. FABRE.

Séance du 6 juin 1946.

Présidence de M. GASTINEL.

PRÉSENTATION D'OUVRAGE

M. Lépine : La Société a reçu du professeur Americo Braga, de l'Institut Biologique de Rio de Janeiro, un ouvrage sur les Sérum, vaccins, allergènes et immunogènes (1). En fait, c'est, en quatre volumes, un compendium de toutes nos connaissances sur les vaccins, les sérum et les antigènes que l'auteur a entendu rédiger. Sous une forme concise

(1) Americo Braga, *Sóros, vacinas, alergenos e imunigenos* (Préface du professeur ROSENBUCH), 4 vol. Imprensa Nacional, Rio de Janeiro. 1943.

et pratique, l'ouvrage résume toute la technique de la sérologie et de l'immunologie moderne. La bibliographie est abondante, les renseignements nombreux comprenant jusqu'à la législation de chaque pays sur le sujet. Chacun des chapitres consacré à un germe ou à un antigène est dédié à un des maîtres de la bactériologie, et terminé par un résumé en français. C'est un livre que l'on pourra consulter avec profit et qui fait grand honneur à son auteur.

COMMUNICATIONS

L'ANATOXINE STAPHYLOCOCCIQUE PURIFIÉE RÉSULTATS CLINIQUES ET SÉROLOGIQUES

par A. BOCAGE, P. MERCIER et J. PILLET.

L'anatoxine staphylococcique peut être aisément purifiée par la méthode de A. Boivin, à l'aide d'acide trichloracétique (1). On sait, en effet, que cet acide précipite les toxines et anatoxines dans toute la zone des pH s'étendant au-dessous de 4 ; c'est le pH 3,5 qui, à l'expérience, est apparu comme le plus recommandable. Le précipité trichloracétique d'anatoxine est ensuite redissous dans un alcali faible et la solution ainsi obtenue est soumise au contrôle biologique *in vitro* et *in vivo* pour préciser sa richesse antigénique.

Depuis plus d'un an, l'anatoxine staphylococcique délivrée pour l'usage humain est toujours purifiée, car nous espérions diminuer ainsi les réactions locales et générales dues au traitement. Ces réactions sont de plusieurs sortes : les unes, provoquées par les constituants propres de l'anatoxine, ne peuvent évidemment pas être évitées. Par contre, il est possible de débarrasser l'anatoxine, par précipitation à l'acide trichloracétique, de la plus grande partie des substances étrangères apportées par le milieu de culture et responsables pour une part des réactions constatées au cours du traitement.

Posologie et résultats. — Nos malades traités à notre consultation de l'hôpital Pasteur ont reçu au minimum les six injections habituelles, par voie hypodermique, depuis 1/10 de centimètre cube jusqu'à 2 cm³, dans l'intervalle de quatre jours.

Les Réactions que nous avons constatées ont toujours été de faible intensité : l'injection est douloureuse pendant trois à cinq minutes, comme avec toutes les anatoxines (présence d'aldéhyde formique libre), et on constate habituellement, durant vingt-quatre à quarante-huit heures, une zone d'érythème de diamètre variable, en moyenne de la taille d'une pièce de 2 francs. Mais, fait intéressant, les réactions générales, en particulier l'hyperthermie, ont été exceptionnelles ; nous n'avons pas noté non plus d'autres accidents locaux ou généraux : adénopathie, poussée d'urticaire, coliques, etc.

(1) A. BOIVIN, *C. R. Acad. Sci.*, 1936, 203, 284.

L'anatoxine purifiée représente donc un avantage incontestable au bénéfice du malade, si l'on prouve que la purification n'entraîne pas un affaiblissement dans l'efficacité thérapeutique de l'anatoxine. Les statistiques résumées dans le tableau ci-dessous nous renseignent immédiatement à ce sujet.

Malades traités en 1943 à l'hôpital Pasteur.

AFFECTIONS	NOMBRE de cas traités	GUÉRISONS	AMÉLIORATIONS nettes	ÉCHECS ou récidives
Furonculose accidentelle ou chronique.	134	110	12	12
Onyxis	2	2		
Hidrosadénite	6	6		
Sycosis	4	4		
Acné pustuleuse	15	3	10	2
Ulcères	2			2

Si l'on veut bien se reporter aux statistiques que nous avons publiées antérieurement avec G. Ramon et R. Richou, on constate que les résultats sont de valeur égale, qu'il s'agisse d'anatoxine ordinaire ou de purifiée (2).

Pour confirmer ces résultats, nous avons pratiqué chez un certain nombre de malades, huit jours après la dernière injection, un dosage d'antitoxine spécifique. Les chiffres obtenus varient de 4 à 30 unités antitoxiques, comparables donc à ceux que nous avions notés antérieurement avec l'anatoxine brute. On sait l'importance de l'antitoxine dans le développement de l'immunité antistaphylococcique, nous avons appelé l'attention sur elle à diverses reprises (3). S'il est vrai que certains malades paraissent guérir avec un taux d'antitoxine relativement bas, et que, chez d'autres, le traitement échoue malgré une teneur plus forte du sérum en antitoxine, ces exceptions résultent des variations individuelles, tant dans la localisation des lésions que de leur ancienneté, et qu'aussi, de la nature du terrain. Nous ne pouvons pas espérer, en biologie, atteindre un pourcentage de guérisons de 100 p. 100 et nous pensons que, lorsqu'une thérapeutique a pu se développer en dix ans, comme c'est le fait pour l'anatoxine staphylococcique, elle a subi une épreuve d'efficacité et d'innocuité indiscutable.

(2) A. BOCAge et P. MERCIER, *Bull. Soc. Franç. Dermat. et Syphil.*, 1935, no 6. — G. RAMON, A. BOCAge, R. RICHOU et P. MERCIER, *Presse méd.*, 1936, no 57, 1139. — M. DEFRENCE, L'Anatoxine Staphylococcique purifiée. Etude expérimentale et clinique. *Thèse Paris*, 1937 (Vigot, édit.). — G. RAMON, R. RICHOU, P. MERCIER et G. HOLSTEIN, *Bull. Acad. Méd.*, 1944, 128, 651.

(3) G. RAMON, A. BOCAge, R. RICHOU et P. MERCIER, *Rev. Immunol.*, 1936, no 6, 551.

**ÉVOLUTION
DE L'ACTIVITÉ DIASTASIQUE DES FILTRATS
DE CERTAINES CULTURES
DANS LES HEURES QUI SUIVENT
'LEUR ENSEMENCEMENT**

par R. SEIGNEURIN.

Une culture microbienne n'a pas, dans les heures qui suivent son ensemencement, des propriétés biologiques constantes. En particulier, on sait depuis longtemps que la taille des bactéries, leur poids, leur charge électrique, leur virulence même, varient avec l'âge de leurs cultures, comme l'ont établi de nombreux auteurs (1).

Continuant la série de recherches que nous avons entreprises sur ce sujet (2), nous nous sommes adressé cette fois à une activité diastasique facile à déterminer, le *pouvoir gélatinolytique des cultures de staphylocoque doré*. A notre connaissance, cette recherche n'a fait l'objet d'aucune communication. Nous trouvons seulement signalé, dans le même ordre d'idées, le fait (3) que l'activité hémolytique de toxines *perfringens* atteint son maximum cinq à sept heures après l'ensemencement, puis diminue.

Nous avons borné notre étude aux premières quarante-huit heures de développement microbien. Pour avoir des données comparables, nous avons préparé une grande quantité d'un milieu de culture liquide constitué, par parties égales, de peptone de panse de porc (peptone Martin) et de bouillon de veau (mort-né), glucosé à 1,50 g. p. 100 et ajusté finalement à pH 8,5. Ce milieu liquide est réparti en tubes à raison de 10 cm³ par tube ; une fois l'ensemencement effectué, les tubes sont portés à l'étuve à 37° et mis en position inclinée pour assurer l'aérobiose maxima.

Nous avons utilisé différentes souches de staphylocoque doré, toutes récemment isolées soit de pus, soit d'hémocultures. Chacune d'elles a été repiquée tous les deux jours, à raison d'un ensemencement d'environ 10 millions de germes.

La mesure du pouvoir gélatinolytique a été effectuée selon le procédé classique : à 1 cm³ d'une solution stérilisée de gélatine à 3 p. 100 portée à 45°, on ajoute des quantités croissantes (0,1 à 1 cm³) du filtrat des cultures précédentes. On agite et on maintient à 45° pendant quatre heu-

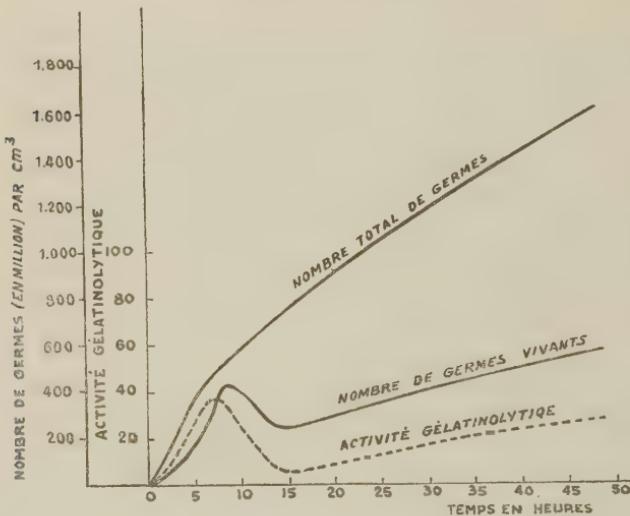
(1) RÉGNIER, Mlle LAMBIN et JUND, *C. R. Soc. Biol.*, 1938, 128, 742 et 744. — KOSSOVITCH, *C. R. Soc. Biol.*, 1938, 129, 823. — WATROUS, *J. inf. Dis.*, 1937, 60, 47. — LASSEUR, *Tr. Lab. Microb. Fac. Pharm. Nancy*, 1928, 4, 35. — SHEIRER, *J. Hyg.*, 1922, 24, 77.

(2) SEIGNEURIN, *C. R. Soc. Biol.*, 1938, 129, 135 ; *Ibid.*, 1939, 130, 701 et 703 ; *Ibid.*, 1939, 131, 682.

(3) GUILLAUMIE, *ces Annales*, 1944, 70, 86.

res (dans d'autres séries d'expériences, nous avons, pour plus de commodité, maintenu à 37° pendant dix heures). On porte ensuite à la glacière (+2°) pendant cinq à six heures, et l'on note au bout de ce temps quelle est la plus petite quantité de filtrat qui a provoqué la gélatinolyse. Supposons que ce soit 0,3 cm³, on dira que l'activité gélatinolytique est $\frac{1}{0,3} = 3,3$. Nous avons utilisé conjointement un autre procédé

qui nous a donné des résultats superposables : la solution de gélatine est introduite par aspiration dans des tubes à sémination sanguine de 1 mm. de diamètre et de 20 cm. de longueur, gradués en millimètres ; on laisse refroidir en obturant les deux extrémités ; on les plonge



ensuite dans les filtrats à étuver, sur une longueur de 5 mm. environ. On abandonne à 25-30° pendant quinze jours, et on note ensuite la longueur de la colonne de gélatine qui a été liquéfiée ; la mesure de l'activité gélatinolytique se traduit par une longueur en millimètres : c'est ce qu'indique le graphique ci-contre.

Il montre que l'activité gélatinolytique des filtrats de cultures de staphylocoque doré atteint son maximum cinq à six heures après l'ensemencement décroît jusqu'à la quinzième heure, puis recommence à augmenter régulièrement et faiblement au cours des heures suivantes. Nous retrouvons ici cette notion, sur laquelle nous avons insisté dès 1938, que les propriétés physico-biologiques des cultures subissent de grandes variations dans les premières vingt-quatre heures qui suivent leur ensemencement, et que la période de cinq à sept heures est tout à fait particulière.

Comme, dans le cas présent, cette période correspond à un maximum d'activité, on pouvait se demander si elle était en relation avec le nombre total de germes, ou avec leur poids total. Or, il n'en est rien. On pou-

vait alors supposer qu'elle était en rapport avec le nombre de *germes vivants*. L'expérience a montré que cette hypothèse est en partie justifiée (voir graphique), mais qu'un autre facteur doit certainement s'y ajouter.

En résumé, cinq à six heures après l'ensemencement, l'activité diastasique des filtrats est maxima, et égale, résultat intéressant, à celle qui ne sera atteinte qu'au bout de six à huit jours de culture.

(*Laboratoire des Hôpitaux de Grenoble.*)

DE L'ACTION BACTÉRIOSTATIQUE *IN VITRO* DES EXTRAITS DE LEVURE DE BIÈRE ET DE BACTÉRIES DU VINAIGRE

par R. SEIGNEURIN, G. CARRAZ, A. ROUX et S. SYNDICO.

Dans cette note, nous voudrions faire connaître l'important pouvoir bactériostatique exercé, *in vitro*, par des extraits, d'une part de *levure de bière* (provenant de brasseries), d'autre part de *bactéries de copeaux* (provenant de *vinaigreries*). Chose curieuse, alors que les recherches poursuivies jusqu'à ce jour visent le plus souvent des éléments dont la récolte ou la culture est laborieuse, en voici au contraire deux que l'industrie fournit en quantité considérable, et dont il est relativement aisé d'extraire les principes actifs.

Nous avons en effet procédé à l'extraction, ou plus exactement à la concentration des principes actifs, de la façon suivante :

1^o La levure fraîche est essorée, déshydratée par l'alcool et épaisse par solvants organiques en pH acide ; les résidus d'épuisement sont épaisés une seconde fois, et la totalité des liquides d'extraction évaporée sous pression réduite à une température n'excédant pas 45° ; la distillation est poussée jusqu'à obtention d'un certain pourcentage de résidu liquide.

Abandonné à la glacière, le résidu se sépare en deux couches, l'une liquide inactive, l'autre solide active ; le précipité peut être repris par un solvant organique en pH acide, et la chromatographie sur magnésie permet d'obtenir des couches nettement distinctes qui sont de haut en bas : marron, lilas, grisâtre pâle, jaune d'or ; le précipité peut être également repris par l'eau. En pH alcalin ou neutre, on obtient des solutions stables très actives.

2^o On utilise, pour les bactéries sur copeaux provenant de vinaigreries, la même méthode et les mêmes solvants organiques, mais on ne repasse pas par la phase aqueuse.

Des précipitations fractionnées permettent encore de concentrer les principes oligodynamiques de ces extraits.

Les essais bactériostatiques ont été conduits de la façon suivante : on coule de la gélose nutritive en boîte de Petri, et on l'ensemence, après refroidissement, avec des cultures de vingt-quatre heures de germes divers, tous récemment isolés de l'organisme. L'émulsion est soigneusement étalée avec un fil coudé. Immédiatement après, on dépose, à la surface de la gélose ainsi ensemencée, une gouttelette de l'extrait aqueux

(neutralisé) à essayer, à l'aide d'une anse de platine de 2 mm. de diamètre. On porte à 37° pendant quarante-huit heures, et on note, au bout de ce temps, les zones d'inhibition qui se manifestent sous forme de cercles clairs de diamètre proportionnel à l'intensité du pouvoir bactériostatique. En outre, un chauffage à 100° pendant cinq minutes de l'extrait essayé n'altère pas son pouvoir bactériostatique, non plus qu'un chauffage de trente minutes à 56°. À la température ordinaire, son activité demeure la même pendant plus d'un mois.

Ci-contre, le tableau résumant les résultats obtenus. Pour plus de commodité, nous avons adopté la notation suivante :

Diamètre du cercle d'inhibition supérieur à 20 mm	+++
Diamètre du cercle d'inhibition de 10 à 20 mm	++
Diamètre du cercle d'inhibition de 5 à 10 mm	+
Diamètre du cercle d'inhibition inférieur à 5 mm	±

GERMES	LEVURE DE BIÈRE Extraction en pH			BACTÉRIES DU VINAIGRE Extraction en pH acide	
	alcalin	neutre	acide	dessiccation	azéotrope
				à 60°	
<i>Staphylocoque doré</i> . . .	0	0	+++	+	++
<i>Pneumocoque</i>	0		++		
<i>Streptocoque</i>	0		++		
<i>Bacille diphtérique</i> . . .	0		++		
<i>Bacille d'Éberth</i>	0		0	++	+
<i>Bacille para A</i>	0		0	++	
<i>Bacille para B</i>	0		0	+	+
<i>Proteus</i>	0		0	+	+
<i>B. coli</i>	0		0	+	++

CONCLUSION. — Si l'action bactéricide de la levure de bière sur le staphylocoque est connue et employée en thérapeutique depuis longtemps, celle sur les autres germes ne l'est pas, non plus que celle des bactéries du vinaigre. Il est d'autre part curieux de constater que l'action de ces deux extraits se complète mutuellement, ce qui ouvre d'intéressantes perspectives, sur leur éventuelle utilisation. Des essais sont d'ailleurs en cours sur d'autres germes, et *in vivo*.

APPLICATION DE LA PÉNICILLINE AU DIAGNOSTIC DE LA RAGE PAR INOCULATION INTRACÉRÉbraLE

par P. LÉPINE, Ch. VIALA et V. SAUTTER.

Le diagnostic de la rage des rues chez les animaux mordeurs par inoculation aux animaux de laboratoire est rendu habituellement difficile et souvent impossible par suite de l'état de contamination ou de putré-

faction des produits adressés au laboratoire, soit que le prélèvement du névraxe ait été effectué sans précaution d'asepsie, soit qu'il ait eu lieu sur un animal tué d'une décharge dans la tête ou mort depuis quelque temps déjà, voire même enterré depuis plusieurs jours.

Il est classique en pareil cas, au lieu d'inoculer les animaux par voie intracérébrale, de procéder à l'inoculation du produit suspect dans les muscles de la nuque. Cette technique, qui entraîne en cas de succès des retards à l'incubation, échoue souvent, soit par non-transmission de la rage, l'inoculation intramusculaire n'étant pas un mode de choix, soit encore par suite de la septicité de l'injection, qui tue les animaux en quelques jours.

Nous avons avec succès mis à profit l'action bactéricide de la pénicilline et son inefficacité sur le virus rabique pour assurer la transmission de la rage par voie intracérébrale, même à partir des produits les plus contaminés.

Il suffit de préparer, comme à l'ordinaire, une émulsion du névraxe suspect, sans se préoccuper de son degré de contamination secondaire. L'émulsion est faite dans une petite quantité d'eau distillée, puis décanlée. A 0,5 cm³ du liquide virulent obtenu on ajoute une quantité suffisante d'une solution concentrée de pénicilline extemporanément préparée, pour obtenir 1 cm³ de suspension renfermant 8 à 10.000 U.O. de pénicilline par cm³. Le produit peut être injecté directement par voie intracérébrale sans déterminer d'accidents septiques, l'incubation de la rage n'est pas modifiée et l'on obtient ainsi des succès dans des conditions où l'inoculation intramusculaire aurait conduit à un échec certain. Voici à titre d'exemple le premier essai auquel nous avons procédé.

Le 4 avril 1946, nous recevons de Corse un cerveau prélevé sur un âne suspect de rage pour avoir été mordu quelque temps auparavant par un chien enragé. Le cerveau a mis longtemps à voyager et arrive dans un état de putréfaction avancée : coloration verdâtre, odeur nauséabonde. L'examen bactériologique montre sur frottis de très nombreuses bactéries de divers types ; les cultures aérobie et anaérobies poussent très abondamment. Un essai d'inoculation à l'animal entraîne la mort des animaux en vingt-quatre heures.

Le 10 avril, on prélève en cinq endroits de la masse putréfiée des fragments de cerveau qui sont broyés dans 0,5 cm³ d'eau. On y ajoute une quantité égale d'eau dans laquelle on a dissous au préalable un comprimé de 8.000 unités de pénicilline. Le mélange est laissé une demi-heure à la glacière, puis inoculé par voie intracérébrale à deux lapins et dans les muscles de la nuque à trois cobayes. Les deux lapins présentent les premiers symptômes de rage le 25 avril, sont paralysés le 26 et meurent tous deux le 27 (dix-huitième jour). L'examen histologique montre les lésions types de rage, avec encéphalite, nombreux corps de Negri typiques. Par contre, les trois cobayes inoculés par voie intramusculaire survivent sans présenter aucun symptôme pathologique. S'ils avaient été seuls inoculés, force eût été de conclure à un résultat négatif.

La méthode nous paraît devoir rendre des services et mériter d'être retenue pour le diagnostic de la rage.

(Institut Pasteur, Service des Virus.)

**CONTRIBUTION A L'ÉTUDE
DE LA VITALITÉ DES SPIROCHÈTES RÉCURRENTS
SURVIVANCE
DE *SPIROCHÆTA PERSICA* DSCHUNKOWSKY 1912
EN ORGANES RÉFRIGÉRÉS OU PUTRÉFIÉS
DE COBAYES INFECTÉS EXPÉRIMENTALEMENT**

par M. BOURGAIN.

Une première série d'expériences (1) nous avait permis de constater que *Spirochæta persica* conservait en organes de cobayes infectés expérimentalement, organes réfrigérés entre 0° et 8°, un certain pouvoir infectant pour l'animal, au septième jour de la réfrigération. Actuellement, les résultats expérimentaux nous autorisent à affirmer qu'à + 4° dans de tels organes infectés, la survie spirochétique sans atténuation de virulence, est au moins de dix-neuf jours, sans toutefois se prolonger jusqu'au vingt-cinquième. Cette survie à + 4° est d'autant plus frappante qu'à + 37°, dans ces mêmes organes infectés et immersés en sérum physiologique, la survie spirochétique est inférieure à quatre jours.

Les recherches furent pratiquées sur des fragments d'organes (foie, rate, reins) prélevés aseptiquement et placés à + 4°, à sec, en boîtes de Petri stériles dès le sacrifice de l'animal infecté, après contrôle sanguin attestant la pullulation spirochétique. Les inoculations furent pratiquées par voie sous-cutanée pour chaque animal neuf, à raison de 1,3 cm³ d'un filtrat grossier sur gaze stérile, de broyats mixtes d'organes infectés (foie, rate, reins : 2 cg. de chaque dans 6 cm³ de sérum physiologique). L'immersion prolongée à + 4°, en sérum physiologique, de tels organes, semble ne rien changer aux résultats acquis.

Spirochæta persica demeure visible après coloration au Giemsa, sur le frottis des broyats de tels organes réfrigérés, jusqu'au dix-neuvième jour de la réfrigération, sous sa forme typique sanguicole et sans apparition de formes anomalies. La recherche directe devient d'autant plus longue et plus difficile que le délai de séjour en glacière est plus grand en raison d'une réduction progressive jusqu'à épuisement du nombre des spirochètes. Toutes les inoculations pratiquées sur cobayes, à partir des filtrats sur bougies L3 des broyats de tels organes réfrigérés, sont demeurées négatives, même quand les spirochètes étaient visibles sur les frottis colorés des prélèvements directs organiques. Ces divers résultats

(1) M. BOURGAIN, *Bull. Soc. Path. exot.*, 1945, 38, 12.

ne nous permettent pas d'attribuer à *Spirochæta persica*, au cours de sa survie en organes réfrigérés une phase filtrante ou de granule spirochétogène. Il ne paraît pas non plus exister de multiplication spirochétienne et, d'autre part, il semble que la raréfaction du nombre des spirochètes est d'autant plus rapide et prononcée que la lyse tissulaire est plus accélérée et plus accentuée. Cette concordance des lyses tissulaires et spirochétaines est des plus frappante à 37° ; s'agirait-il donc d'une manifestation fermentaire, enzymatique spéciale, inhibée ou réduite à + 4° et activée à + 37°, permettant de supposer une certaine identité de composition chimico-biologique entre la cellule animale et *Spirochæta persica* mais demeurant inopérante sur la plupart des microbes (souillures ou apports expérimentaux) qui au contraire continuent à se développer dans le milieu tissulaire lysé ?

Dans un travail antérieur (1), nous avions pu constater également que dans les cadavres en putréfaction de cobayes infectés expérimentalement et abandonnés aux températures ordinaires (+11° à +15°), la survie de *Spirochæta persica* atteignait près de quatre jours ; actuellement, une nouvelle série expérimentale nous a permis d'enregistrer la présence de ce spirochète à l'examen direct, après coloration au Giemsa, dans les frottis d'organes putréfiés, jusqu'au septième jour de la mort de l'animal. L'inoculation des broyats d'organes de tels cadavres, n'infecte plus l'animal neuf à partir du huitième jour de la mort. Cette survivance spirochétienne dans les organes putréfiés est certainement fonction de la température ambiante et semble également marcher de pair avec l'état de lyse cellulaire.

Relevé des résultats expérimentaux :

TABLEAU I. — Pouvoir infectant des organes réfrigérés à + 4°.

COBAYES D'ÉPREUVE	DURÉE DU SÉJOUR des organes en glacière à + 4°	RÉSULTATS
I	8 jours. .	Inoculation au cobaye positive. A l'examen direct, après coloration au Giemsa, présence de spirochètes récurrents, dans les broyats d'organes avant l'inoculation.
II	8 jours (organes immersés en sérum).	<i>Id.</i>
III	15 jours.	<i>Id.</i>
IV	19 jours.	<i>Id.</i>
V	21 jours.	Inoculation au cobaye négative. A l'examen direct, après coloration au Giemsa, absence de spirochètes récurrents, dans les broyats d'organes avant inoculation.
VI	25 jours.	<i>Id.</i>
VII	25 jours (organes immersés en sérum Φ).	<i>Id.</i>

TABLEAU II. — Pouvoir infectant
des organes immersés en sérum physiologique et placés à +37°.

COBAYES D'ÉPREUVE	DURÉE DU SÉJOUR des organes en sérum Φ à 37°	RÉSULTATS
VIII	20 jours.	Inoculation au cobaye <i>négative</i> . A l'examen direct, après coloration au Giemsa, <i>absence</i> de spirochètes récurrents dans les broyats d'organes, avant inoculation. Lyse tissulaire totale.
IX	15 jours.	<i>Id.</i>
X	8 jours.	<i>Id.</i>
XI	4 jours.	<i>Id.</i> (Lyse tissulaire moins marquée).
XII	4 jours (90 heures).	<i>Id.</i>

TABLEAU III. — Pouvoir infectant des organes de cadavres putréfiés.

COBAYES D'ÉPREUVE	DÉLAIS cadavériques	RÉSULTATS
XIII	12 jours.	Inoculation au cobaye <i>négative</i> . A l'examen direct, après coloration au Giemsa, <i>absence</i> de spirochètes récurrents, dans les broyats d'organes, avant inoculation.
XIV	8 jours.	<i>Id.</i>
XV	7 jours.	Ces 3 cobayes sont morts de piqûres septiques avec gangrène marquée du tissu cellulaire, avant l'expiration du temps d'incubation nécessaire à l'apparition des spirochètes dans le sang circulant. A l'examen direct, après coloration au Giemsa, <i>présence</i> de spirochètes récurrents dans les broyats d'organes avant inoculation.
XVI		
XVII		
XVIII	6 jours.	Inoculation au cobaye <i>positive</i> . A l'examen direct, après coloration au Giemsa, <i>présence</i> de spirochètes récurrents dans les broyats d'organes avant inoculation.

CONCLUSIONS. — 1° *Spirochæta persica* survit sous sa forme type sanguicole pendant au moins dix-neuf jours à +4°, dans les organes réfrigérés de cobayes infectés expérimentalement.

2° La survie de ce spirochète récurrent s'arrête au huitième jour de la mort du cobaye, dans le cadavre putréfié, abandonné aux températures ordinaires (+11° à +15°).

3° A température d'étuve (+37°) *Spirochæta persica* ne survit pas quatre jours en organes infectés, immersés en sérum physiologique.

DÉNATURATION DU PLASMA PAR LE FORMOL ET LA CHALEUR

par A. LUTZ.

Chauffé à 56° le plasma citraté (à 3,5 p. 1.000 de citrate trisodique purifié cristallisé) d'homme ou de cheval à pH 7,4-7,5 donne un abondant précipité de fibrinogène.

L'action combinée du formol et de la chaleur produit une dénaturation qui stabilise ces plasmas.

I. — Nous avons ajouté des quantités croissantes de formol (formol Lambiotte à 40 p. 100) à des quantités constantes de plasma (10 cm³) réparties en ampoules scellées. Ces ampoules sont portées à l'étuve à 37° et au bout de temps variables on éprouve la stabilité du plasma en le portant pendant une heure au bain-marie à 56°. Voici les résultats obtenus exprimés en densité optique donnés par l'électrophotomètre avec des plasmas humains.

PLASMA HUMAIN citraté à pH 7,5	EXPÉRIENCE I Temps d'étuve à 37°						EXPÉRIENCE II 5 jours
	0	1 jour	2 jours	3 jours	4 jours	5 jours	
	Immersion au bain-marie à 56° pendant une heure						
Volume de formol ajouté à 10 cm ³ de plasma citraté.	Précipité.	Précipité.	Précipité.	Précipité.	Précipité.	Précipité.	Précipité.
0,5 p. 1.000	Précipité.	Opalescence	> 190	> 190	> 190	> 190	> 190
1 p. 1.000	> 190	100	97	92	88	68	87
1,5 p. 1.000	Précipité.	82	71	68	65	55	63
2 p. 1.000	Précipité.	60	58	55	55	54	55
2,5 p. 1.000	Précipité.	56	55	54	55	54	52
3 p. 1.000	Précipité.	56	"	"	"	"	52

Ce tableau montre que pour une concentration de formol comprise de 2 à 2,5 p. 1.000 la *densité optique* du plasma reste inchangée. Au cours de chauffage le plasma est stable.

L'action du formol sur le fibrinogène se manifeste donc par une dénaturation telle que cette protéine ne coagule plus par la chaleur à 56°.

Portons ces chiffres sur un graphique en mettant en abscisse les temps de réaction, en ordonnée les densités optiques.

L'examen de ces courbes montre que :

1° L'action du formol sur le fibrinogène est proportionnelle à sa concentration.

2° Elle se fait en deux étapes :

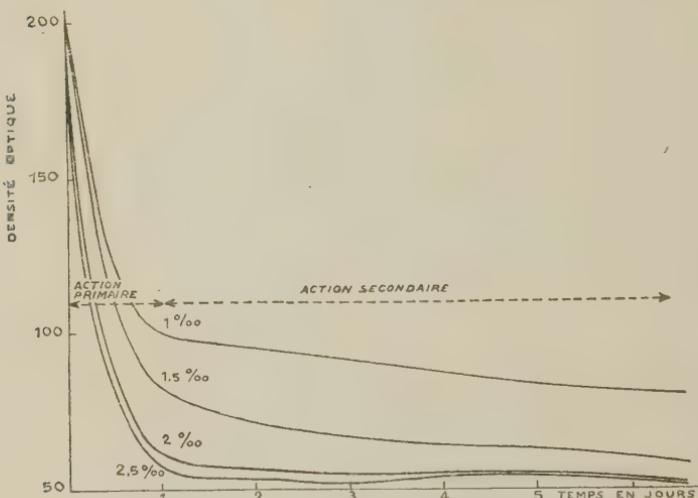
a) Action primaire, rapide ;

b) Action secondaire lente et progressive.

On peut rapprocher ces faits des données établies par J. Loiseleur et Crovisier qui ont montré que les acides aminés optiquement actifs subissaient par le traitement au formol une variation importante du pouvoir rotatoire :

1^o Variation primaire immédiate s'accompagnant d'une variation considérable du pH et dont l'intensité est fonction de la concentration du formol ;

2^o Variation secondaire lente et progressive n'affectant pas le pH, pro-



portionnelle à la concentration en formol, liée à une modification complexe de sa molécule.

II. — Par ailleurs la fluorescence en lumière de Wood des plasmas traités à 56° augmente proportionnellement aux taux de formol.

En rapprochant ces faits des données établies par J. Loiseleur et R.-O. Prudhomme, à savoir que :

1^o La fluorescence apparaît progressivement avec un caractère d'irréversibilité ;

2^o L'intensité et sa rapidité d'apparition dépendent de la nature de chaque acide aminé et de la température.

On peut penser que la molécule de fibrinogène est le siège de cyclisation interne et apparition de chaînes hétérocycliques hexagonales jouant le rôle de fluorophore.

CONCLUSION. — Le formol dénature le fibrinogène et le rend incoagulable par la chaleur à 56°.

(Institut Pasteur. Laboratoire de M. Dujarric de la Rivière.)

UTILISATION AU LABORATOIRE DES LAMPES FLUORESCENTES

par P. MANIGAULT, J. MAGROU et F. MARIAT.

Les nouvelles sources lumineuses dites « tubes fluorescents » utilisent le principe suivant : dans un tube de verre contenant de la vapeur de mercure et de l'argon sous pression réduite, on établit une décharge électrique. La vapeur de mercure émet un rayonnement ultra-violet qui excite la fluorescence de substances appropriées disposées en couche mince sur la paroi intérieure du tube. On transforme ainsi une source d'ultra-violet en une lampe donnant une lumière dont la composition spectrale dépend de la nature de l'écran fluorescent.

On trouve dans le commerce plusieurs modèles appelés « lumière du jour », « blanc technique », « blanc », « blanc du soir », etc., qui diffèrent par la composition de l'écran fluorescent. Tous se ramènent à deux types susceptibles d'être alimentés respectivement en courant alternatif 110 volts et 220 volts à 50 périodes seconde. Les tubes ont un diamètre de 28 mm. et une longueur d'encombrement de 0,47 m.

L'amorçage de la lampe et sa stabilisation sont obtenus au moyen d'un dispositif auxiliaire connecté d'une part aux deux bornes de la lampe fluorescente et d'autre part aux deux fils d'amenée du courant. Donc, en pratique, aucune modification n'est apportée aux installations usuelles d'éclairage pour l'utilisation des lampes à fluorescence.

La lampe étant éteinte, il suffit pour l'allumer d'appliquer aux bornes de l'appareil auxiliaire la tension du secteur, en fermant le circuit par un interrupteur usuel. C'est l'appareil auxiliaire qui provoque s'il y a lieu la faible surtension nécessaire au passage de la première décharge, cette tension étant nettement inférieure au double de celle du réseau de distribution. De plus il assure dans tous les cas une stabilité de fonctionnement qui rend la lampe fluorescente très peu sensible aux variations de tension du réseau, l'intensité admise n'étant que de l'ordre de 0,250 A pour les tubes de 28 mm. de diamètre. Enfin il comporte un dispositif antiparasite qui exclut toute perturbation électrique dans le voisinage.

Ces lampes fluorescentes présentent de très nombreux avantages dont voici les principaux :

1^o La technique de la fluorescence permet de réaliser maintenant la synthèse d'une lumière blanche très supérieure par sa qualité aux lumières artificielles actuelles et physiologiquement satisfaisante.

2^o Elles consomment peu et ont un rendement plus élevé que les lampes à incandescence (30 à 35 lumens par watt).

3^o Leur faible brillance, qui ne dépasse pas 0,3 bougie par centimètre cube permet de les employer sans écran diffusant ni réflecteur, ce qui assure la meilleure utilisation de la totalité du flux émis.

4^o La forme allongée du tube permet d'atteindre une grande uniformité d'éclairage.



FIG. 1. — En haut et à droite, tomates exposées à la lumière fluorescente; en haut et à gauche, tomates témoins; en bas et à droite, tabacs exposés; en bas et à gauche, tabacs témoins. Semés le 2 janvier 1946, photographiés le 15 février 1946. (Clichés Jeantet.)



FIG. 2. — En haut et à droite, carottes exposées à la lumière fluorescente; en haut et à gauche, carottes témoins; en bas et à droite, pommes de terre exposées; en bas et à gauche, pommes de terre témoins. Semées le 2 janvier 1946, photographiées le 15 février 1946. (Clichés Jeantet.)

5° Elles dégagent très peu de chaleur, ce qui permet de les placer sans inconvenients très près et jusqu'au contact des objets à éclairer, même s'ils sont fragiles.

6° Leur durée est telle qu'au bout de deux mille heures la diminution du flux lumineux est inférieure à 20 p. 100.

La première application que nous ayons faite de ces lampes au laboratoire a déjà fait l'objet d'une note aux comptes rendus des séances de l'Académie des Sciences (1).

Il s'agit d'un dispositif d'éclairage artificiel des semis réalisés dans les serres expérimentales de l'Institut Pasteur. Alors que l'éclairage en janvier par le vitrage actuel n'est jamais supérieur à 1.500 lux, nous avons obtenu au moyen de lampes fluorescentes une augmentation de l'éclairage de 3.000 lux. Les sources lumineuses utilisées sont des tubes à fluorescence L 30 dits « lumière du jour » qui nous ont été donnés par les établissements Claude Paz et Silva. Un seul tube de 1 m. de longueur et 28 mm. de diamètre permet d'éclairer 9 pots de 9 cm. et ne dépense que 30 W. La lampe est placée au début à 2 cm. du sol. On l'élève au fur et à mesure de la croissance des plantes. La diffusion de la lumière est très bonne, l'échauffement inappréhensible, aussi les plantes croissent-elles normalement sans s'étioler et les feuilles entourent parfois le tube sans aucun inconvenient.

On a cultivé des témoins à la seule lumière du jour dans des conditions identiques de température et d'humidité. Les semis ont été effectués le 12 janvier et dès le 19 janvier les différences entre les plantes essayées et les témoins étaient considérables. Elles se sont encore accentuées après un premier repiquage le 19 janvier et peuvent s'exprimer le 19 février par les observations suivantes :

	HAUTEUR MOYENNE en centimètres	
	Plantes essayées	Plantes témoins
Carottes	16	6
Tomates	16	3
Tabac	5 à 6	1
Pomme de terre	6	0

Les plantes essayées sont vigoureuses, sans difformité de taille, tout à fait semblables à celles que l'on obtient dans des conditions normales de croissance en mai (fig. 1 et 2).

Ainsi pouvons-nous envisager pendant toute l'année et à très peu de frais, indépendamment de la saison, la production de plantes indispensables aux expériences en cours au laboratoire (culture de tissus végétaux, obtention de protéines virus, travaux de sélection).

Ces lampes fluorescentes sont déjà très répandues dans les laboratoires étrangers, en Amérique, en U.R.S.S. Dans le domaine de la biologie végétale elles servent à des recherches sur la meilleure composition spectrale de la lumière et sur la durée optima de l'éclairage, mais il est évident qu'elles se prêtent à des applications bien plus variées.

(1) J. MAGROU, P. MANIGAULT et F. MARIAT. *C. R. Acad. Sci.*, 1946, 222, 521.

Par exemple, on a décrit récemment un montage dont l'auteur (2) préconise l'emploi de tubes fluorescents pour permettre l'examen stéréoscopique de films radiographiques. Les lampes sont à proximité immédiate des films et donnent un éclairage intense, bien diffusé, sans échauffement préjudiciable à la pellicule (toutes conditions qui ne sauraient être remplies simultanément par des lampes à incandescence).

Le grand électro-aimant de Bellevue est éclairé par des tubes « lumière du jour » qui gardent aux objets leur couleur naturelle sous la lumière artificielle.

Les établissements Claude Paz et Silva ont créé un « blanc technique », lumière très voisine de celle émise directement par le ciel du nord couvert de nuages blancs. L'emploi de telles lampes convient particulièrement à l'examen des teintes au laboratoire et dans l'industrie.

ÉTUDE CHROMATOGRAPHIQUE DU PIGMENT DE *CL. CORALLINUM*

par M. MACHEBOEUF, A.-R. PREVOT, M. RAYNAUD et G.-N. COHEN.

Dans diverses communications antérieures, deux d'entre nous ont décrit un germe anaérobiose chromogène nouveau : *Cl. corallinum* (1). L'étude chimique du pigment de cette nouvelle espèce bactérienne a été rendue possible par la culture en assez grande quantité de ce germe en milieu liquide. Les cultures en bouillon V.F. glucosé âgées de sept à neuf jours, sont centrifugées. Le culot de germes est traité par dix fois son poids environ d'alcool méthylique absolu à froid. L'extraction est renouvelée une seconde fois. Les corps microbiens cèdent dans ces conditions toute la substance colorée à l'alcool méthylique. La solution méthylique ainsi obtenue est évaporée à sec sous pression réduite à température inférieure à 50° C. Le résidu d'aspect huileux est épuisé par l'éther à froid. On obtient ainsi une solution éthérée rouge et il reste un dépôt d'apparence graisseuse, de couleur jaune. La solution éthérée rouge est chromatographiée sur silicate d'alumine anhydre. On observe sur la colonne la série suivante de zones différemment colorées :

En haut, une zone rouge rose.

Plus bas, une zone marron orangé.

Enfin, une zone jaune pâle.

La zone jaune se déplace lentement sous l'action de l'éther et les substances correspondantes sont recueillies après un certain temps, en bas de la colonne. La solution éthérée jaune ainsi obtenue sera purifiée par une chromatographie ultérieure sur alumine (solution A).

(2) ROGER W. STAMM, Amer. J. Roentgenology & Radiumtherapy, 1941, 45, 744.

(1) A.-R. PRÉVOT et M. RAYNAUD, ces Annales, 1944, 170, 182 et 185.

Le développement du chromatogramme est poursuivi par l'éther à 4 p. 100 de méthanol. La zone rouge passe au-dessous de la zone marron et se dédouble : un anneau rouge corail descend très lentement : on le désigne par le numéro II. Un anneau rouge violacé descend plus rapidement ; on le recueille en bas de la colonne : corps III. La colonne est alors sectionnée entre l'anneau supérieur marron orangé et la zone rouge corail. Le corps II est élué par le méthanol à 95 p. 100. La fraction marron orangé traitée par l'alcool méthylique ne laisse passer en solution qu'un corps rouge, en quantité d'ailleurs minime, et qui est éliminé. Le corps marron orangé ne peut être élué que par l'alcool méthylique additionné de 1 p. 100 d'acide chlorhydrique. La solution marron orangé ainsi obtenue est désignée par le numéro VI.

La solution éthérée jaune obtenue précédemment (solution A) est chromatographiée sur une colonne d'alumine. On observe une zone supérieure jaune qui ne se déplace pas sous l'influence de l'éther. Au-dessous, on note un anneau orangé rouge, puis un anneau vert. L'anneau vert descend lentement sous l'action de l'éther seul et passe le premier en bas de colonne. On le recueille : corps numéro IV. L'anneau orangé rouge est élué sur colonne par l'éther à 4 p. 100 de méthanol ; il passe seul : corps numéro V.

La colonne est alors sectionnée et le corps jaune élué par du méthanol pur : Corps I.

On obtient ainsi finalement six corps qui diffèrent soit par leur couleur, soit par leur comportement chromatographique. Au point de vue quantitatif, les fractions IV, V et VI sont en très faible quantité, et leur étude spectrographique n'a pu pour cette raison être effectuée en détail. Elles ne représentent que des constituants d'importance secondaire. Les fractions I, II et III sont, au contraire, toutes trois en quantité importante. Les solutions correspondantes sont évaporées à sec sous pression réduite, le résidu est repris par l'éther, et on effectue une deuxième chromatographie sur silicate d'alumine. Chaque corps se comporte comme dans l'expérience précédente. Cette deuxième opération permet d'éliminer plus complètement les substances d'accompagnement. On obtient ainsi, en définitive, des solutions méthyliques des corps I, II et III. Les corps II et III sont pratiquement insolubles dans l'eau.

Le corps I ne change pas de teinte avec le pH. Il reste jaune.

Le corps II est orangé jaune en alcool méthylique acidifié par ClH et rouge violacé en alcool méthylique additionné de soude ou de potasse.

Le corps III est orangé jaune en alcool acide et rouge en milieu alcalin.

RÉSUMÉ. — Le pigment de *Cl. corallinum*, de couleur rouge violacé a été analysé par chromatographie. On a pu séparer au moins 6 substances différentes d'après leur couleur et leur comportement chromatographique. Les corps IV (vert), V (orangé rouge) et VI (marron orangé) n'existent qu'en très faible quantité. Les constituants principaux sont les corps I (jaune), II (rouge corail) et III (rouge violacé).

ÉTUDE SPECTROGRAPHIQUE DU PIGMENT DE *CL. CORALLINUM*

par G.-N. COHEN et M. RAYNAUD.

Dans une note antérieure (1), nous avons montré que les solutions brutes du pigment de *Cl. corallinum* contenaient au moins 6 corps différents dont les 3 principaux sont :

Le corps I, jaune, ne changeant pas de teinte avec le pH, et les corps II, orangé rouge en milieu acide, rouge violacé en milieu alcalin et III, orangé-rouge en milieu acide et rouge en milieu alcalin.

Nous avons recherché les spectres d'absorption de ces trois substances, en solution dans l'alcool méthylique, dans le domaine des radiations ultraviolettes et dans celui des radiations visibles. Nous avons employé pour l'ultraviolet le grand spectrographe universel pour chimiste de Zeiss avec prisme de Hünfner, à optique de quartz et à secteur tournant; la source de lumière ultraviolette est une lampe à hydrogène, à spectre continu, système Chalonge. Pour le visible, nous avons employé un appareillage identique à optique de verre et une lampe à filament incandescent.

Le logarithme du coefficient d'absorption, défini par la relation :

$$I = I_0 10^{-\epsilon \cdot c \cdot l}$$

a été mesuré à un facteur constant près, la concentration C étant inconnue.

La solution du corps I, dans les conditions où elle a été obtenue,吸orbe d'une manière continue et croissante, du visible à l'ultraviolet, et ceci, que le milieu soit neutre, acide ou alcalin. Nous donnons ci-dessous un tableau récapitulant les valeurs des maxima et minima des corps II et III en milieux neutre, acide et alcalin.

II		III		ALCALIN	
NEUTRE		ACIDE		ALCALIN	
Maximum	Minimum	Maximum	Minimum	Maximum	Minimum
5.370 Å	4.500 Å	5.380	4.560	5.370	4.520
NEUTRE		ACIDE		ALCALIN	
1 ^{er} max.	1 ^{er} min.	2 ^e max.	2 ^e min.	1 ^{er} max.	1 ^{er} min.
5.020	4.350	4.000	3.800	5.030	4.400
5.380	4.540				
ALCALIN					
Maximum	Minimmm				

(1) M. MACHEBOEUF, A.-R. PRÉVOT, M. RAYNAUD et G.-N. COHEN, ces *Annales*, 1946, 72, 93.

L'examen de ces chiffres et des courbes ci-dessous amène les observations suivantes :

a) Le corps II donne, quelle que soit la réaction du milieu, des

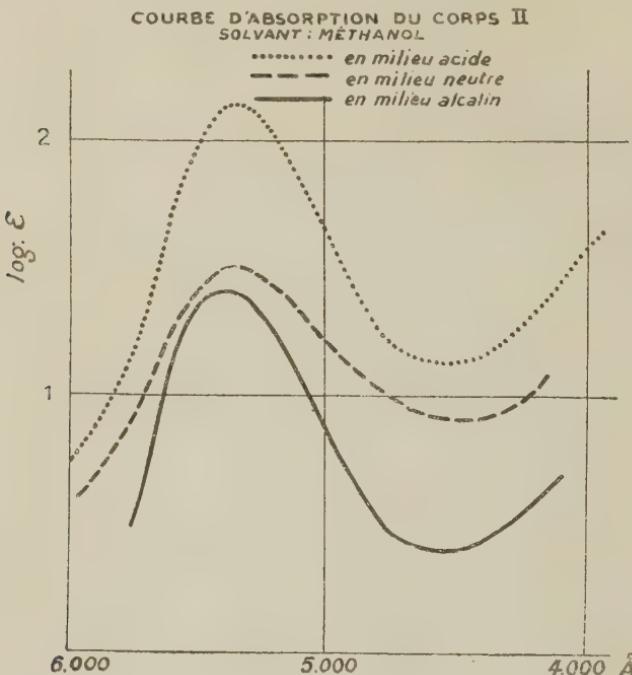


FIG. 1.

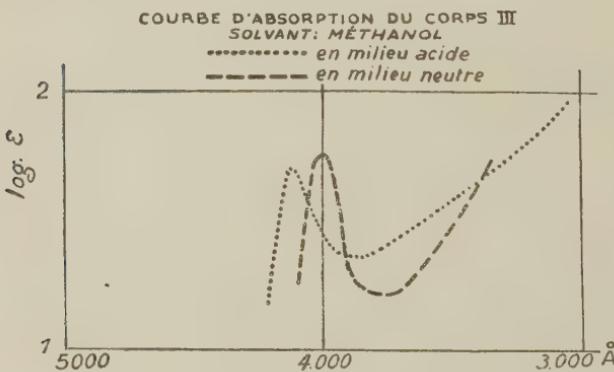


FIG. 2.

valeurs sensiblement identiques pour ces maxima et ces minima. On note en milieu acide un grand élargissement de la bande d'absorption qui rend compte du passage du rouge violacé à l'orangé rouge, en même temps qu'une intensité plus grande de l'absorption.

b) Le corps III a un premier maximum et un premier minimum dont les valeurs ne varient pas par acidification, alors que les deuxièmes maximum et minimum, situés dans l'ultraviolet, subissent un dépla-

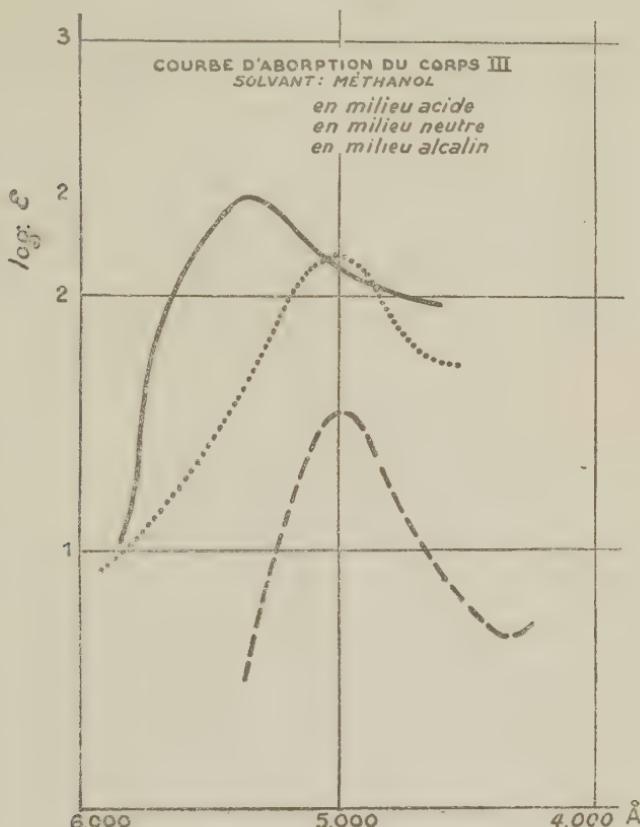


FIG. 3.

cement de 100 angströms vers le visible dans les mêmes conditions. L'alcalinisation a ici pour effet de déplacer la première bande d'absorption des 350 angströms vers les grandes longueurs d'onde et de faire disparaître la seconde bande d'absorption. En milieu acide, l'intensité de l'absorption est augmentée pour la première bande et inchangée pour la seconde (2).

(2) Les valeurs des maxima et des minima ont été déterminées par enregistrement microphotométrique à l'aide de l'appareil de Sannié (Bouty, constructeur).

Nous adressons nos vifs remerciements à M^{me} GUILMART et à M. PRUDHOMME, qui ont bien voulu mettre à notre disposition leur appareillage et nous aider de leurs conseils.

La communication suivante a paru en Mémoire dans les *Annales de l'Institut Pasteur*.

Recherches sur les variations des propriétés enzymatiques chez les bactéries. II. Sur une mutation affectant le pouvoir de synthèse de la méthionine dans une souche d'*Aerobacter aerogenes*, par J. MONOD.

Séance du 4 juillet 1946.

Présidence de M. NÈGRE.

NÉCROLOGIE

M. Nègre : Notre Société vient encore d'être frappée par la mort de M. Philippe Lasseur et de M. L. Nattan-Larrier.

Philippe Lasseur était professeur de Microbiologie à la Faculté de Pharmacie de Nancy. Travailleur acharné, bien que d'une constitution délicate, notre collègue s'était fait connaître dans le monde savant par ses recherches en microbiologie générale et en sérologie. Les plus importantes sont celles qu'il a effectuées sur les bactéries chromogènes : *B. chlororaphis* et *B. monnieri*. Lasseur a étudié la nutrition de ces germes en milieux chimiques nettement définis et a obtenu leurs pigments à l'état pur et cristallisé. Il a démontré l'influence de traces de fer sur la production de ces derniers. Il a, d'autre part, apporté une contribution importante à la question des mutations en microbiologie en étudiant les variations microbiennes à partir d'une culture monocellulaire.

Lasseur avait su grouper autour de lui toute une pléiade de chercheurs qu'il animait de sa flamme et qui lui étaient très attachés. Il avait constitué avec eux une association qui publiait les travaux effectués dans son service au moyen d'un recueil paraissant en fascicules.

Notre collègue entretenait des relations très étroites avec l'Institut Pasteur. Plusieurs d'entre nous se souviennent du très chaud accueil qu'ils ont reçu de lui et de ses élèves à la Faculté de Pharmacie de Nancy. Nous n'oubliions pas non plus la part importante qu'il a prise à la constitution de notre Société.

Nous adressons à sa femme, M^{me} Andrée Dupaix-Lasseur, qui a été sa collaboratrice, l'expression de toute notre tristesse et de notre vive sympathie.

Nous avons appris aussi avec beaucoup de peine la mort de notre collègue L. Nattan-Larrier, professeur au Collège de France.

Les plus anciens d'entre nous se rappellent qu'au début de sa carrière scientifique, il a été l'assistant de Laveran.

Le passage de Nattan-Larrier à l'Institut Pasteur, dans le service du grand maître, avait orienté ses recherches vers la pathologie exotique. Il a pu continuer à les poursuivre dans la chaire créée pour lui au Collège de France. Avec ses élèves B. Noyer et M^{me} Grimard-Richard, il y a effectué de nombreux travaux sur les leishmanioses, sur les trypanosomes du débab marocain et du hamster, et sur les immunsérumums dans les trypanosomiases. Mais le sujet qui a le plus longuement retenu son attention est celui de la perméabilité placentaire, du passage à travers le placenta des toxines, des antitoxines et de la transmission héréditaire des anticorps. Ces recherches ont été effectuées avec G. Ramon, Lépine, Grasset et divers autres collaborateurs.

Nattan-Larrier a publié, en 1931 et en 1934, deux volumes d'un *Traité de Microbiologie* auxquels plusieurs membres de l'Institut Pasteur ont collaboré. Les relations amicales qu'il avait avec un grand nombre d'entre nous, nous font participer d'une façon encore plus intime au chagrin de sa famille, à laquelle nous adressons nos condoléances émues.

COMMUNICATIONS

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE *LISTERIA MONOCYTOGENES*

par M. BELIN.

J'ai pu montrer en 1933 l'existence en France de listériose ovine (1) puis tout récemment de listériose équine (2).

Celle-ci est intéressante, car jusqu'ici le cheval était considéré comme réfractaire à cette maladie [Pirie] (3). En 1944, Krage (4) avait pu isoler une *Listeria* chez deux pouoins nouveau-nés. Or, c'est une véritable enzootie que j'ai étudiée, entièrement comparable à ce que l'on observe chez les bovins et les ovins. Le cheval n'est donc nullement réfractaire à cette maladie.

L'examen de ces 2 souches m'a permis de constater les faits suivants : Contrairement à l'opinion généralement admise, l'isolement de *L. monocytogenes* peut être obtenu en partant des viscères de malades et cela très facilement sur gélose et en bouillon peptoné. C'est de cette façon que j'ai obtenu mes souches ovine et équine. Mais il m'est arrivé aussi, en utilisant des viscères prélevés dans de bonnes conditions et examinées rapidement, de n'obtenir aucune colonie de *Listeria*. J'ai noté seulement que dans ces cas il y avait dans les cultures divers microbes

(1) M. BELIN et A. LAGRIFFOUD, *Bull. Acad. Vétér. de France*, 1943, **16**, 376.

(2) M. BELIN, *Bull. Acad. Vétér. de France*, 1946, **19**, 176.

(3) J.-H.-H. PIRIE, *Nature*, 1940, **145**, 360.

(4) KRAGE, *Berl. Münch tier Wochenschr. et Wiener tier. Monatschr.*, 1944, **30**, 31.

secondaires. L'examen des centres nerveux est donc utile, mais non indispensable.

L. monocytogenes cultive faiblement à +5°. Elle donne de bonnes cultures à la température du laboratoire, 14° à 18°, avec de nombreuses formes mobiles. Pour obtenir celles-ci il n'est donc pas nécessaire de cultiver à 20° [Harvier, Lagrange et Claisse (5)]. Il arrive qu'à 37° on ne trouve aucun élément mobile, ce qui fut le cas pour ma souche équine.

Suivant la qualité des bouillons, la culture se rassemble au fond du tube soit en un dépôt facile à remettre en suspension, soit en un culot cohérent qui s'élève en torsade à l'agitation et qui se dissocie plus ou moins facilement.

Le sérum ajouté au bouillon donne des cultures fortement agglutinées jusque vers 1 p. 250. Au delà l'action du sérum est faible. Il faut tenir compte de cette agglutinabilité déjà signalée par le sérum de cheval non infecté pour les *Listeria*, quand on fait un séro-diagnostic.

Glucose, lévulose, saccharose favorisent la culture en eau peptonée. La glycérine agit de même, mais plus faiblement et plus tardivement.

Avec la souche ovine le lait tournesolé décoloré a pris ensuite et conservé une légère teinte rose. J'ai constaté une faible fermentation de l'arabinose.

Par inoculation intrapéritonéale de 1 cm³ à 1,2 cm³ de cultures en bouillon peptoné vingt-quatre heures à 37°, j'ai toujours obtenu la mort des cobayes en six à huit jours. J'ai pu observer chez de très gros cobayes, chez lesquels la maladie évolue un peu plus lentement, un ou deux jours avant la mort, la contracture des muscles masticateurs. Ce fait n'a pas encore été signalé. Il est important car il reproduit un des caractères essentiels de la maladie naturelle chez le cheval et le mouton. Cela va à l'encontre de l'opinion qui tend à faire de *Listeria* un microbe de sortie.

Chez les gros cobayes, le foie présente des fins nodules de nécrose, à la limite de la visibilité, signalés par Forgeot, Truche, Staub et Lamy. Ils peuvent ne pas apparaître macroscopiquement chez les jeunes cobayes.

On obtient facilement la *Listeria* dans les milieux de cultures usuels en partant des viscères et des centres nerveux de ces cobayes. Les cultures les plus abondantes sont données par le foie.

Toutefois j'ai pu constater avec ma souche équine, chez un cobaye mort le vingt-troisième jour seulement (accusant donc une assez rapide diminution de la virulence), des îlots de nécrose sur les reins seulement.

Cet organe m'a donné une abondante culture ; les milieux ensemencés en partant du foie sont restés stériles.

Ces 2 souches ovine et équine ont donné avec une grande netteté la réaction conjonctivale chez le cobaye [Auton] (6).

Les inoculations sous-cutanées et intramusculaires, doses 1 cm³ bouillon peptoné, cultures de vingt-quatre heures étuve, sont bien supportées par le cobaye. Elles l'immunisent contre l'injection péritonéale.

(5) P. HARVIER, G.-H. LAVERGNE et R. CLAISSE, *Paris méd.*, 10 mai 1943, 125.

(6) W. AUTON, *Zentralbl. Bakter.*, 1934, 134, 89.

J'ai recherché l'immunité chez un cobaye femelle en gestation qui avait reçu quelques semaines avant l'injection de culture sur le globe oculaire. Cette femelle avorta quelque temps après l'instillation. Je ne pus malheureusement pas examiner les abortus. Or l'injection péritonéale, qui tua le cobaye témoin en vingt-trois jours, tua celui-ci en deux jours. A l'examen nécropsique apparut au niveau du point de pénétration de l'aiguille à travers la tunique abdominale, une infiltration hémorragique du tissu conjonctif, suivant un cercle ayant son centre en ce point et qui avait environ 2 cm. de diamètre. L'utérus était viollement congestionné. Cependant la culture ne me donna pour cet organe que de très rares colonies de *Listeria*. Manifestation analogue aux phénomènes de Shwartzman, de Sanarelli et d'Arthus, avec hypersensibilité très marquée. La conjointive n'a pas réagi. C'est probablement l'infection utérine qui a dû jouer le rôle d'infection préparante.

La listériose est une maladie très grave. Dans les deux enzooties que j'ai étudiées, 10 morts sur 11 moutons atteints ; 3 morts sur 3 chevaux atteints. Il semble, d'après quelques auteurs, que la médication sulfamidée permette d'intervenir utilement. Le seul mouton sauvé ici l'a été après intervention d'un sulfamide.

Le diagnostic au laboratoire doit donc être fait très rapidement. Il semble que le fait d'obtenir un bacille dont les caractères de culture sur gélose et en bouillon et la morphologie rappellent *Erysipelothrix rhusopathiae*, mais qui est très mobile cultivé à la température du laboratoire, permette dans des cas d'encéphalo-myélite de penser à la listériose et de conseiller immédiatement la médication sulfamidée. On complètera ensuite l'examen en recherchant notamment la réaction conjonctivale du cobaye.

(Institut Bactériologique de Tours.)

PRÉSENCE D'HISTAMINE DANS LA CHAIR D'UN THON RESPONSABLE D'UNE INTOXICATION COLLECTIVE

par R. LEGROUX, D. BOVET et J. C. LEVADITI.

A la fin d'août 1945, nous recevons, à l'Institut Pasteur, un morceau de thon cru dont un malade demande l'examen parce qu'il lui impute un malaise brutal qui, la veille, avait atteint 4 des 5 personnes composant sa famille. Le jour précédent ils avaient reçu de Concarneau un thon frais qu'ils ont mangé en partie au repas de midi. Dans la demi-heure qui a suivi la fin du repas, ils ont été atteints d'une crise d'urticaire géante dont les placards très prurigineux ont disparu en quelques heures.

Comme le thon incriminé avait été pêché au milieu de l'été, qu'il était parvenu à Paris par chemin de fer, à un moment où les transports étaient ralentis, conditions favorables à une pullulation bactérienne, c'est vers l'étude bactériologique que se sont tout d'abord dirigées nos investigations.

Le fragment de thon apporté à l'Institut Pasteur pesait de 4 à

500 g. Sa teinte était blanc rosé, son aspect huileux, il n'avait aucune odeur désagréable et sa chair était ferme.

Etude bactériologique. — A l'examen microscopique des frottis de muscle, il n'y a pratiquement ni corps bacillaire, ni spores, ni levures, ni filaments mycéliens, seules de très rares coques Gram positives sont visibles.

1 cm³ d'une suspension de broyage de la chair musculaire est ensemençé en gélose-gélatine profonde ; après vingt-quatre heures à 37°, seules quelques colonies de germes aérobies ont apparu. Aucun développement n'a lieu dans la zone d'anaérobiose.

Les germes sont donc rares et aucune pullulation bactérienne notable ne permet d'invoquer une altération de la chair du thon par des enzymes microbiens.

Etude du pouvoir pathogène. — Un fragment de thon gros comme un pois, est broyé dans 5 cm³ d'eau physiologique et 1 cm³ de cette suspension est injecté par voie intramusculaire à un cobaye. Une à deux minutes après l'injection, l'animal d'abord inquiet, s'immobilise, il : quelques secousses musculaires des membres puis de violentes convulsions et succombe brusquement cinq minutes après l'injection. Un second cobaye inoculé dans les mêmes conditions avec une dose moindre meurt en sept minutes. A l'autopsie de ces animaux on note une congestion importante des muqueuses de l'estomac et de l'intestin grêle. La même suspension après avoir été mise en ampoule scellée est portée vingt minutes dans un bain-marie à l'ébullition. Après ce chauffage elle est encore toxique mais tue le cobaye en vingt minutes au lieu de sept minutes. Enfin le liquide de suspension filtré à travers une bougie Chamberland L3 est toujours pathogène.

Il existait donc une substance toxique, thermostable, filtrable, dont il fallait préciser la nature. Ce ne pouvait être une toxine bactérienne, car aucune d'elles n'agit de la sorte et ne résiste à l'ébullition, ce n'était pas non plus un corps de la chimie minérale car aucun d'eux n'est capable de provoquer, chez l'homme, une intoxication aussi rapide et aussi passagère. Par contre, étant donné la stabilité de l'histamine et l'analogie des symptômes observés avec ceux du choc histaminique expérimental c'est vers sa recherche, ou vers celle d'une amine毒ique ayant des propriétés biologiques analogues, que devait se diriger notre étude.

Etude pharmacodynamique. — Nous avons recherché sur la suspension de thon l'effet inhibiteur d'un anti-histaminique de synthèse étudié par Bovet et M^{lle} Walther (1) : le N.P.methoxybenzyl-N.dimethylamino-ethyl-amidopyridine (2786 R. P. ou Neo-antergan). Nous avons vérifié au préalable l'action du Neo-antergan sur l'intoxication histaminique du cobaye. Un animal reçoit en injection intramusculaire 1 mg. d'histamine cristallisée en solution dans 1 cm³ d'eau physiologique, il meurt en sept minutes après des convulsions semblables à celles des cobayes intoxiqués avec la suspension de thon. Un second cobaye reçoit en même temps que l'injection de la même dose d'histamine, mais dans l'autre cuisse, 3 cm³ d'une solution à 1 p. 1.000 de 2786 R. P. : il est complètement protégé et reste normal.

(1) D. BOVET et M^{lle} F. WALTHERT, *Supplément aux Ann. Pharm. françaises*, 2^e année, n° 4, septembre-décembre 1944.

Un troisième cobaye reçoit par voie intramusculaire 1 cm³ de la suspension de thon broyé (1 g. par centimètre cube d'eau physiologique clarifiée sur terre d'infusoires, puis filtrée sur bougie Chamberland L3) l'animal meurt en dix-sept minutes. Un quatrième cobaye, après avoir reçu la même suspension que le cobaye précédent, reçoit dans l'autre cuisse 3 cm³ de la solution à 1 p. 1.000 de Néo-antergan, il reste parfaitement bien portant.

Le 2786 R. P. protège donc les cobayes aussi bien contre la substance toxique contenue dans le thon que contre l'action de l'histamine. Etant donné l'identité des symptômes et la spécificité d'action du Néo-antergan, il s'agissait là plus que vraisemblablement d'histamine.

Dale et Laidlaw (2), Guggenheim et Löffler (3), Feldberg et Schilf (4) ont montré que l'histamine détermine *in vitro* la contraction de l'intestin isolé de cobaye. Ungar, Parrot et Bovet (5) ont complété ces recherches en empêchant *in vitro* cette contraction de l'intestin à l'aide d'un antihistaminique. Nous avons donc utilisé ces épreuves.

L'intestin isolé de cobaye est plongé dans 100 cm³ d'une solution de tyrode non glucosée ; l'adjonction à ce tyrode de 10 γ d'histamine ou de 1/10 de cm³ de la suspension de thon diluée à 1 p. 100 détermine des contractions brusques et de même intensité. 10 γ de 2786 R. P. ajoutés dans le bain-marie à 38° contenant l'intestin de cobaye suppriment totalement l'effet de l'un comme de l'autre des deux produits, aucune contraction n'a lieu et cependant cet intestin n'a pas perdu sa contractilité car lors d'un dernier essai l'acétyl-choline de synthèse déclenche à nouveau une contraction.

Les résultats des tests physiologiques effectués *in vivo* et *in vitro* sur l'organisme du cobaye concordent donc et permettent d'affirmer l'existence d'histamine dans la chair du thon incriminé. De plus ces expériences permettent d'apprécier avec une certaine approximation la quantité d'histamine présente dans la chair de ce thon : elle devait contenir plusieurs grammes d'histamine par kilogramme : au moins 1 g. si l'on se réfère aux expériences *in vivo* et 4 g. environ, d'après les expériences *in vitro*.

La réaction de Lewis (6) a permis une dernière vérification. Sur la peau scarifiée de 3 sujets l'étalement de 10 γ d'histamine aussi bien que de 1/10 de centimètre cube de la suspension de thon diluée à 1 p. 100 déclenche la triade réactionnelle de Lewis : rougeur locale, œdème, et enfin aréole érythémateuse dite réflexe. Les papules très prurigineuses sont apparues cinq minutes après le dépôt des liquides sur les scarifications, elles se sont effacées en trente minutes (7).

(2) H.-H. DALE et P.-P. LAIDLAW, *J. Phys.*, 1910-1911, **41**, 318.

(3) M. GUGGENHEIM et W. LÖFFLER, *Bioch. Zeitchr.*, 1915, **72**, 325 et M. GUGGENHEIM, *Die Biogenen Amine*, S. KARGER, Bâle, 1940.

(4) W. FELDBERG et E. SCHILF, *Histamin*, S. Springer, Berlin, 1930.

(5) G. UNGAR, J.-L. PARROT et D. BOVET, *C. R. Soc. Biol.*, 1937, **124**, 445.

(6) Voir G. ROUSSY et M. MOSINGER, *Presse méd.*, 1933, no 33, 665.

(7) Pour identifier l'histamine il est possible également de s'adresser à des méthodes chimiques. Elles dérivent de la réaction de Pauly. Mais cette réaction, semblable à la diazo-réaction d'Ehrlich, ne permet pas de distinguer l'histidine de l'histamine qui en dérive par décarboxylation. Récemment, Halpern avec Viennet (*C. R. Soc. Biol.*, 1946, **140**, 215), avec Viennet et

CONCLUSION. — De l'ensemble de ces constatations nous pouvons conclure que l'histamine était certainement le corps qui avait déclenché cette crise d'urticaire aiguë consécutive à l'ingestion de la chair de thon.

Comment la quantité d'histamine que nous avons constatée dans la chair du thon, quantité 1.000 fois plus grande que celle constatée dans les organes à l'état normal, a-t-elle pu être produite ? Plusieurs hypothèses sont plausibles.

La décarboxylation de l'histidine, normalement présente dans la chair de thon, pourrait être produite par un enzyme d'origine bactérienne, mais il n'y avait pas de développement bactérien dans l'échantillon que nous avons examiné. Une histidase d'origine viscérale aurait pu agir sur les muscles voisins de la paroi abdominale mais dans ce cas la chair entière du thon n'eût pas été nocive. Une cytolysé aseptique, provoquée par une température élevée et prolongée au mois d'août, pourrait expliquer la présence d'histamine dans toutes les fractions de l'animal, mais la chair examinée était ferme et la quantité d'histamine décelée était bien supérieure à celle de l'histidine normalement présente chez le thon.

Ne pourrait-on, enfin, invoquer un état physiologique normal de l'animal, à l'époque du fraîchissement par exemple, qui entraînerait la présence d'histamine dans tout le corps ? Mais la fraieson a lieu pendant l'hiver pour le thon, et la rareté des accidents que nous signalons ne permettrait qu'un changement physiologique exceptionnel.

(*Institut Pasteur.*)

Patte (*C. R. Soc. Biol.*, 1946, 140, 212), a indiqué un procédé de dosage spécifique de l'histamine par électro-photométrie à l'aide également de la réaction de Pauly. Lors de nos recherches, en août 1946, cette méthode de dosage n'étant pas encore publiée, nous nous sommes adressés uniquement aux tests pharmacodynamiques. A l'avenir lorsqu'une nouvelle intoxication de ce type se produira c'est aussi bien aux recherches chimiques qu'aux recherches pharmaco-dynamiques qu'il faudra recourir.

Le Gérant : G. MASSON.